

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

LUCIANO ANTONIO LACAVA

Classificação de Balneabilidade de Praia através de Dois Indicadores de Contaminação Fecal (*Escherichia coli* e Enterococos) e Utilização de Perfis Resistência Antimicrobiana e RFLP-PCR para Identificar Fontes de Contaminação Fecal

Itajaí, SC
2005

LUCIANO ANTONIO LACAVA

Classificação de Balneabilidade de Praia através de Dois Indicadores de Contaminação Fecal (*Escherichia coli* e Enterococos) e Utilização de Perfis Resistência Antimicrobiana e RFLP-PCR para Identificar Fontes de Contaminação Fecal

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, na Universidade do Vale do Itajaí, Área de Concentração em Biotecnologia Ambiental Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros

Itajaí, SC
2005

*Feliz aquele que transfere o
que sabe e aprende o que
ensina. (Cora Coralina)*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que sempre esteve a meu lado em todos os momentos que precisei e sempre me atendeu prontamente nas horas mais difíceis.

A minha mãe (Ielva) e meus irmão (César e Paulo), que sempre me deram o carinho que se espera de uma família.

A querida Aline, a quem nunca me deixou desistir, e me apoiou sempre, tanto em meu trabalho quanto na minha vida pessoal. Não chegaria até aqui sem ela.

A meus grandes amigos de trabalho, Benjamin, Rodrigo, Robert, Jonas, Maurício, Estela e Rope; considero-me abençoado em trabalhar com vocês.

A toda família do Colégio agrícola, em especial ao Júnior, Pocera, Mário, Bárbara, Amaral, Buss, Pereira, Abel, Afonso, Vicente, Ricardo e Sanderlei que me acolheram em minha nova casa e sempre me apoiaram neste caminho.

A meus amigos e irmãos Benjamin, Rodrigo (Cebola) e Flávio; minha família fora de casa.

A minha querida amiga Renatinha, que me ajudou a começar tudo isso, com seu trabalho no laboratório e sua amizade fora dele.

A Morgana, Lab. Tecnologia de pescado, sua ajuda em laboratório na parte final foi muito importante.

Ao pessoal do Lab. De Biologia Molecular (Prof. Laura, Thiago e Bel), obrigado pelas portas sempre abertas.

A coordenação e secretária do mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental; Schuwingel e Evandro, obrigado pela força e compreensão na hora que mais precisei de vocês.

E por fim e não mais importante, pelo contrário, ao meu orientador e amigo Marco, o qual me ensinou muito, na profissão e na vida, e que nunca deixou de pensar no que era melhor para mim.

A todos que passaram por minha vida, pois cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha. Mas não vai sozinha e nem nos deixa só. Sempre leva um pouco da gente deixando um pouco de si... Esta é a prova mais bela em nossa vida... A prova que cada um é importante e que ninguém se aproxima de ninguém por acaso.

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO.....	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTARCT	ix
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Indicadores de Contaminação Fecal.....	02
1.2 Determinação de Fontes de Contaminação Bacteriana.....	04
2 MATERIAIS E MÉTODOS	08
2.1 Avaliação dos Indicadores de Contaminação Fecal.....	08
2.1.1 Área de estudo.....	08
2.1.2 Análises Microbiológicas	09
2.2 Desenvolvimentos Metodológicos para Determinação de Fontes de Contaminação.....	09
2.2.1 Área de estudo.....	09
2.2.2 Coleta de Amostras.....	10
2.2.3 Isolamento e Identificação das Cepas	10
2.2.4 Perfil Antimicrobiano	11
2.2.5 Perfil Molecular	13
2.2.5.1 Extração do DNA	13
2.2.5.2 PCR – Reação de Polimerase em Cadeia do DNA Extraído	13
2.2.5.3 Eletroforese em Gel de Agarose – Produto do PCR	15
2.2.5.4 Corte da Amostra com Enzima de Restrição - RFLP	15
2.2.5.5 Eletroforese em Gel de Agarose – Produto do RFL.....	15
2.3 Análise dos Dados	16
3 RESULTADOS E DISCUÇÃO.....	17
3.1 Comparação dos Indicadores de Contaminação Fecal.....	17
3.2 Perfil Antimicrobiano	22
3.3 Perfil Molecular	27
4. CONCLUSÕES	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
6. ANEXOS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Comparação entre <i>E. coli</i> e Enterococos na Barra Sul, obedecendo à exigência da Legislação Brasileira. II	18
Tabela II- Comparação entre <i>E. coli</i> e Enterococos no Pontal Norte obedecendo, a exigência Legislação Brasileira. Os valores que deram origem tabela estão no anexo II	19
Tabela III- Comparação entre <i>E. coli</i> e Enterococos na Praça Almirante Tamandaré, obedecendo à exigência da Legislação Brasileira. Os valores que deram origem tabela estão no anexo II	21
Tabela IV- Média do tamanho (cm) dos halos de inibição formados pela ação dos antibióticos nas cepas isoladas	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento e purificação de <i>Escherichia coli</i> em Chromocult Coliform Agar®	11
Figura 2. Testes de sensibilidade a antibióticos, por meio de difusão em disco	12
Figura 3. Sensibilidade das cepas de <i>E. coli</i> frente a diferentes antibióticos	13
Figura 4. Termociclador (Mastercycle gradient – eppendorf) utilizado para o PCR	14
Figura 5. Variação do Numero Mais Provável (NMP) de <i>E. coli</i> e Enterococos na Barra Sul e seus respectivos limites e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira	18
Figura 6. Variação do Numero Mais Provável (NMP) de <i>E. coli</i> e Enterococos no Pontal Norte e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira.....	19
Figura 7. Variação do Numero Mais Provável (NMP) de <i>E. coli</i> e Enterococos na Praça Almirante Tamandaré e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira	20
Figura 8. Padrões de agrupamento das fontes das cepas através de respostas aos antibióticos – (programa utilizado – ANOSIM)	23
Figura 9. Produtos obtidos através da amplificação do gene de 16S de <i>Escherichia coli</i> , pela reação em cadeia pela polimerase.....	27
Figura 10. Figura 10 - Fragmentos iguais de DNA obtidos pelo corte com enzimas específicas.	28

RESUMO

O aumento populacional ao redor das bacias hidrográficas juntamente com o crescimento industrial vem acelerando a degradação desses ambientes aquáticos. A contaminação orgânica proveniente principalmente dos despejos de esgotos domésticos pode trazer uma grande quantidade de agentes patogênicos. O grupo de bactérias denominado como coliformes fecais é o indicador de contaminação orgânica mais utilizado no mundo. Este grupo é representado pela bactéria *Escherichia coli*. Além deste outro indicador, os Enterococos, é previsto pela legislação brasileira para classificação das águas quanto sua balneabilidade. A comparação entre estes indicadores mostra que apesar de existir respostas semelhantes às variações de contaminação ambiental, apresentam diferentes interpretações quando comparados com os limite exigidos pela legislação brasileira. Contudo a utilização desses indicadores não nos permite identificar a origem dessa contaminação, que pode ser humana ou de diferentes animais. Para isso utilizou-se testes de perfil de resistência a antibióticos e técnicas de Biologia Molecular. Os antibióticos testados (cloranfenicol, sulfa-trimetropim, polimixina B, gentamicina, ampicilina, cefalotina, imipenem, tetraciclina, estreptomicina, penicilina, eritromicina e vancomicina) permitiram diferenciar amostras de *Escherichia coli* humanas de não humanas. A metodologia de diferenciação molecular utilizada foi eficiente na extração do DNA e amplificação dos fragmentos obtidos. Contudo o perfil de restrição do produto de PCR utilizando primers para 16S, não diferenciou as cepas de diferentes origens. A utilização de marcadores moleculares através das enzimas de restrição (Hind III, Sal, Ecor I e MSE) não mostrou diferença entre as cepas.

ABSTRACT

The population increase around of the hidrografic basins together with the industrial growth comes speeding up the degradation of these aquatics environments. The organic contamination proceeding mainly from the wastewater of domestic origin can bring a great amount of pathogenic agents. The group of bacteria known as fecal coliforms is the most used organic contamination indicator all over the world. This group is represented by the *Escherichia coli*. Beyond this, another indicator, the Enterococs, is approved by the Brazilian legislation for classification of waters used for recreation. The comparison between these indicators shows that although there are similar answers to the variations of ambient contamination, they present different comparative interpretations when is considered the limit demanded by the Brazilian legislation. However the use of these indicators doesn't allow identification the origin of this contamination, which can be from human being or of different animals. For this, it's used tests of resistance profile to antibiotics and techniques of molecular biology. The tested antibiotics (chloramphenicol, sulfa-trimetropim, polimixin B, gentamicin, ampicilin, cephalotin, imipenem, tetraciclín, estreptomycin, penicillin, eritromicin and vancomycin) had allowed differentiating samples of *Escherichia coli* from human of those from animals. The methodology used for molecular differentiation was efficient in the extraction of the DNA and amplification. However the restriction profile of the PCR products using primers for 16S, did not differentiate strains of different origins. The use of molecular markers through restriction enzymes (Hind III, Salt, Ecor I and MSE) showed difference between strains, but not from different origin.

1. INTRODUÇÃO

O elevado crescimento populacional, somado ao constante aumento do setor industrial, vem refletindo o esgotamento e degradação dos recursos hídricos existentes. O gerenciamento desses recursos e a preocupação com o saneamento são pontos básicos para se manter uma qualidade de vida populacional aceitável. Uma das principais fontes de deterioração dos recursos hídricos é a poluição orgânica. O aporte de esgoto doméstico, decorrente do aumento da densidade populacional ao redor de bacias hidrográficas, acelerou o processo de degradação desses corpos de água.

Aproximadamente 60 por cento da população mundial vivem na faixa litorânea, considerada até 100 quilômetros a partir do litoral. Mais de 3 bilhões de pessoas dependem, de uma maneira e de outra, de habitats marinhos e costeiros para obtenção de comida, transporte, disposição de resíduos e principalmente recreação (United Nations Environment Programme, 2003).

O aumento considerável do volume de esgoto doméstico, que são lançados ao mar e outros corpos hídricos já era preocupação no trabalho de Gauthier (1980), como sendo a principal causa das poluições bacterianas nas praias, portos e criadouros de mariscos. Ele aponta este problema como decorrente da ineficiência das estações de tratamento ou o despejo direto e sem controle dos dejetos nos corpos de água.

Um corpo d'água receptor de lançamento de esgoto pode incorporar a si uma ampla gama de agentes transmissores de doenças. A detecção de agentes patogênicos, principalmente de bactérias, protozoários e vírus em uma amostra de água é extremamente difícil, em razão das suas baixas concentrações, o que demandaria um enorme volume de água para que fosse detectado um único organismo patogênico (von Sperling, 1996).

Pelczar *et al.* (1996) cita que infecções transmitidas por água ocorrem quando um microorganismo infeccioso é adquirido por meio desta água

contaminada por matéria de origem fecal, contendo patógenos humanos e animais. Quando esses patógenos contaminam a rede de abastecimento público ou outras fontes de água potável, podem aparecer surtos epidêmicos de doenças intestinais, afetando um grande número de pessoas em um curto período de tempo. A detecção da fonte de contaminação, associada a vários casos, auxilia na determinação da origem de tais epidemias.

Apesar da falta de estudos epidemiológicos, há evidências que em algumas áreas mais poluídas, o contato com o ambiente oferece risco à saúde humana. Como exemplo temos a infecção por hepatite pela ingestão de frutos do mar, de dermatoses pelo contato com a areia da praia e de infecções das vias superiores do sistema respiratório ou dos ouvidos pelo contato direto com água do mar (Tommasi, 1982).

1.1. Indicadores de Contaminação Fecal

Indicadores de contaminação fecal constituem uma das ferramentas mais utilizadas para avaliar a poluição orgânica e com isso determinar o grau de sanidade do ambiente (Turner *et al.*, 1997).

O grupo de enterobactérias denominado como coliformes fecais ou coliformes termotolerantes é um dos indicadores de contaminação fecal mais amplamente utilizados no Mundo. Dentre as bactérias presentes nesse grupo cerca de 90% são compostos pela espécie *Escherichia coli* (Soares & Maia, 1999). Sua concentração em fezes humanas chega a superar 100 milhões de células por grama de matéria fresca (Gerhard, 1987).

De acordo com Campos & Trabulsi (1999) o gênero *Escherichia* é composto por enterobactérias, gran-negativas, o qual é representado por 5 espécies: *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii* e *Escherichia vulneris*. Entretanto a única espécie de maior importância prática é a *Escherichia coli* pois além de ser a mais estudada é a espécie de maior abundância no trato intestinal de animais de sangue quente. Esta espécie compreende grande

número de grupos e tipos sorológicos sendo que alguns podem apresentar características patogênicas normalmente ligadas a infecções intestinais.

Volk et al. (1995) classifica *E. coli* como um parasita intestinal obrigatório, não sendo encontrado naturalmente no ambiente, e sua presença na água evidencia processos de contaminação fecal.

Baudisová (1997), trabalhando com amostras de água em rios e lagos, classificou a bactéria *E. coli* como o melhor indicador de contaminação fecal para corpos de água doce.

Em muitos estudos, não existe um consenso sobre a utilização deste parâmetro como o melhor indicador de poluição fecal no meio aquático. Vários autores contestam esta hipótese, alegando a existência de outros microorganismos que seriam melhores indicadores, por possuírem maior sobrevivência em água salgada, como por exemplo o grupo enterococos (Dionizio et al., 2000; Gabutti et al., 2000; Kay & Fleisher, 1994; Ferguson et al., 1996).

Enterococos também são membros naturais do intestino humano e de animais, e por isso estão presentes em altas concentrações em fezes expelidas ao ambiente (Rince et al., 2000). Estes autores citam que este grupo bacteriano, gram positivo, sobrevive em locais com grande variação de pH e temperatura, como também a altas concentrações de salinidade.

Estudos indicam que enterococos são melhores indicadores de poluição fecal em água marinha devido sua maior resistência neste ambiente (USEPA, 2000).

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente – Conama (2002), as águas são consideradas impróprias para banho quando mais de 20% de um conjunto de amostra obtidas em cinco semanas, houver mais de 800 *Escherichia coli* ou mais de 100 enterococos por 100 mililitros de água. Também são consideradas impróprias amostras que na sua última coleta apresentarem valores superiores a 2000 *Escherichia coli* ou 400 Enterococos por 100 mililitros de água.

Segundo Conama (2002), para avaliar a qualidade de água de uma região pode-se utilizar o grupo Coliformes termo-tolerantes (*Escherichia coli*) ou

Enterococos. Sendo que no caso de se realizar a enumeração de dois indicadores, prevalece o mais restritivo.

Com isso se faz necessário comparar as classificações obtidas com os dois indicadores de qualidade de água, objetivando um melhor controle dos corpos d'água. Bactérias indicadoras com características fisiológicas diferentes podem comportar-se de maneira diferente, dependendo da característica ambiental de cada região. O presente trabalho objetivou comparar a utilização de dois indicadores recomendados pela legislação, verificando a semelhança dos dois grupos no que diz respeito à indicação de qualidade de água.

1.2. Determinação de Fontes de Contaminação Bacteriana

Os Indicadores de contaminação fecal não permitem uma identificação exata da origem dos contaminantes. Essa contaminação, além de origem humana, pode ser proveniente de animais, como aves, mamíferos domésticos e selvagens (Turner *et al.*, 1997).

Frere *et al.* (2000) avaliando a flora bacteriana em gaivotas da espécie *Larus dominicanus*, identificou *E. coli* fazendo parte de 95 % dos organismos presentes nas fezes desta ave.

Em humanos, *E. coli* pode causar quadro clínico de diarreia, colite hemorrágica síndrome uréica hemolítica (Ismaili *et al.*, 1995). Em bovinos, causa diarreia de bezerros recém nascidos (Rycke *et al.*, 1987). Em suínos, causam a doença do edema, aonde a verotoxina ao lesar a células endoteliais dos pequenos vasos, favorece a saída de líquidos para o tecido subcutâneo (Caprioli *et al.*, 1993)

Parveen *et al.* (2001), alerta que a presença de *E. coli* no ambiente aquático não indica somente a presença de fezes humanas e por esse motivo precisa-se identificar métodos para diferenciar a contaminação fecal humana da não humana.

Uma das bases para esse trabalho é de que bactérias indicadoras de poluição fecal, como *Escherichia coli*, apresentam características genéticas peculiares, dependendo da sua origem. Com isso, uma cepa isolada de *E. coli*

proveniente de fezes humanas, tem características genéticas diferentes de cepas isoladas de fezes de suínos (Parveen *et al.*, 2001).

A grande variabilidade de cepas de uma mesma bactéria encontradas no ambiente torna difícil os trabalhos de identificação de fontes de contaminação. Uma das metodologias existentes para diferenciar essas cepas é traçando um perfil de resistência antimicrobiana (Radu *et al.*, 1998; Parveen *et al.*, 2001). Harwood *et al.* (2000) identificaram padrões de ocorrência de enterobactérias, utilizadas como indicadores de contaminação fecal, usando como técnica a resistência por diferentes antibióticos.

Os antibióticos e os quimioterápicos interferem em várias atividades das células bacterianas, causando sua morte ou apenas inibindo seu crescimento. Os primeiros são chamados de bactericidas e os segundos, bacteriostáticos. As interações dos antibacterianos com a célula bacteriana podem ocorrer em nível de parede, membrana citoplasmática, ribossomos, DNA e metabolismo intermediário. A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau desta resistência, é propriedade bastante variável em bactérias. Com isso pode-se agrupar esses microorganismos de acordo com padrões de respostas a diferentes antibióticos (Trabulsi *et al.*, 1999).

A resistência bacteriana tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas vezes essa baixa efetividade está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (Gales *et al.*, 1997).

Animais domésticos e de criação vem recebendo grandes dosagens de antibióticos, seja através de vacinas ou através de alimentos industrializados. Pessanha & Gontijo Filho (2001) mostram que atualmente muitos antibióticos estão sendo adicionados a rações animais, principalmente para aves de corte. Esses antibióticos aceleram a seleção de cepas bacterianas, principalmente de enterobactérias. Com isso concluíram que frangos de corte funcionam como um grande reservatório de genes resistentes a antibióticos.

Brisse e Duijkeren (2005), trabalhando com patologia animal, identificaram diferentes cepas da bactéria *Klebsiella spp.* causadoras de infecções, utilizando padrões de resistência a antibióticos.

Clinicamente, testes de resistência a antibiótico, ainda são uma das principais ferramentas para avaliar padrões adquiridos por bactérias. Esses padrões são decorrentes de seleções de cepas resistentes por tratamentos clínicos ou ingestão de alimentos que receberam dosagens desses medicamentos (Lateef et al, 2005).

Padrões de resistência a antibióticos (antibiogramas), pode ser uma grande ferramenta para diferenciar cepas de bactérias originárias de fontes diferentes. Com isso objetivou-se neste trabalho avaliar a resposta de crescimento de cepas da bactéria *Escherichia coli* isoladas de diferentes fontes naturais (animais e humana) em resposta a diferentes antibióticos.

Nos últimos anos, novas abordagens metodológicas, principalmente o desenvolvimento de novas técnicas de genética molecular, vêm tornando-se útil na geração de um quadro mais completo sobre ecologia microbiana em um dado habitat (Fungaro & Vieira, 1998). O crescimento e aprimoramento das técnicas em biologia molecular vieram a se tornar uma poderosa ferramenta em estudos microbiológicos. A PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) é uma técnica molecular que vem sendo usada em muitos estudos epidemiológicos, principalmente em patógenos humanos (van Belkum 1994 apud Chansiripornchai, et al., 2001).

A reação de Polimerase em cadeia (PCR) é a técnica que permite a amplificação do DNA ou RNA *in vitro*, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela polimerase, enzima termoestável (Saiki, 1988).

Existem vários protocolos que permitem a extração de DNA. No caso do PCR, é possível utilizar-se de um método simples de extração, uma vez que esta técnica requer quantidades mínimas de DNA. Para amplificar uma dada sequência de DNA, três etapas devem ser seguidas: extração do DNA, reação de amplificação (PCR) e eletroforese do produto da reação (Valadares-Inglis & Melo, 1998). Esta técnica permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. Com isso

se obtém *in vitro* várias cópias de um determinado segmento do DNA (Fungaro & Vieira, 1998).

Desde a invenção da eletroforese em gel de amido e da visualização histoquímica das enzimas, estudos clássicos levaram a descoberta de novos marcadores genéticos. A análise de enzimas representou um avanço frente às técnicas citológicas e morfológicas, já que estes novos marcadores não são tão profundamente afetados pela interação com o ambiente e possibilitam um grande avanço na compreensão dos processos micro e macro-evolutivos. No final da década de 60 pesquisadores revolucionaram a Biologia Molecular com a descoberta das enzimas de restrição. Estas enzimas são capazes de digerir uma determinada sequência específica de DNA. Foram isoladas e purificadas de várias linhagens de bactérias. As enzimas são denominadas segundo a linhagem bacteriana da qual foram isoladas, por exemplo, a enzima ECO RI, foi extraída da bactéria *Escherichia coli* e digere a sequência específica 5'- GAATTC-3'. O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é um tipo específico de marcador de DNA, baseado no padrão de fragmento produzido pela digestão de um determinado DNA com uma enzima específica (Arias & Infante-Malachias, 2001).

O desenvolvimento de técnicas para o estudo do DNA através do RFLP propiciou um enorme e acelerado conhecimento da biosistemática, evolução e genética de animais e plantas.

Poucos são os trabalhos realizados no Brasil com o objetivo de identificar a origem das bactérias no ambiente. Utilizando a ferramenta da biologia molecular somada com as tecnologias tradicionais existentes pode-se criar novas ferramentas para trabalhar a favor da saúde do meio ambiente.

Com isso o trabalho objetivou, verificar a existência de padrões moleculares de cepas de *E. coli* proveniente de fontes diferentes. Estes padrões podem se tornar uma nova ferramenta no gerenciamento dos recursos hídricos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Avaliação dos Indicadores de Contaminação Fecal

2.1.1. Área de Estudo

O estudo para comparação dos indicadores de contaminação fecal foi realizado em três pontos da praia central do Município de Balneário Camboriú – SC. A cidade está localizada no litoral centro-norte do Estado de Santa Catarina, ocupando as coordenadas 26°99'06" S e 48°63'47" W (IBGE, 2005). A praia pela sua geografia é considerada uma enseada, possuindo 5,8 Km de extensão e águas relativamente tranquilas (Klein e Menezes, 2000).

A praia central do município de Balneário Camboriú, no ano de 1998 foi apontada como sendo uma das praias de pior balneabilidade do País pela imprensa nacional (ANOTICIA, 2003). Apesar disso, Balneário Camboriú, ainda manteve o título de principal pólo turístico do Sul do Brasil.

Em alguns meses do ano o fluxo de turista deste município faz com que a população aumente em até 7 vezes do número de habitantes locais (Secretaria de Turismo de Balneário Camboriú, 2003). Este aumento preocupa muito, quando falamos de contaminação de corpos hídricos e qualidade de água, pois o sistema de tratamento de esgoto da região não comporta tal variação populacional (Silva *et al*, 2000).

Os três pontos de coletas de amostras na Praia de Balneário Camboriú foram divididos em:

- . Barra Sul – Pontal mais ao sul da praia, sob influencia do Rio Camboriú;
- . Praça Almirante Tamandaré – parte mais central da praia;
- . Pontal Norte – Pontal mais ao norte da praia sob influência do Ribeirão do Marambaia.

Para os três pontos foram realizadas análises quantitativas de *Enterococos* e *Escherichia coli*. As coletas foram realizadas entre os dias 06 de janeiro a 24 de fevereiro do ano de 2003, período em que a cidade recebe o maior número de turistas.

2.1.2. Análises Microbiológicas

As amostras de água foram coletadas em sub-superfície na região da praia entre 80 a 90 cm de profundidade, acondicionadas em caixas térmicas com gelo e levadas para análise em um período inferior a quatro horas.

A quantificação de *Escherichia coli* foi realizada através de substrato cromogênico/fluorogênico, com a técnica de Número Mais Provável (NMP), utilizando o meio COLILERT®/QuantaTray® (IDEXX), descrito pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1999) e aceito pela Legislação Brasileira. Para *Enterococos* foi utilizada a técnica de contagem por tubos múltiplos através do caldo Chromocult Enterocult® (Merck).

Tanto os resultados de *Enterococos* quanto de *Escherichia coli* foram expressos em número mais provável – NMP/ 100 ml de água.

Dados de pluviosidade foram obtidos através da Estação Meteorológica da Universidade do Vale do Itajaí.

2.2. Desenvolvimento Metodológicos para Determinação de Fontes de Contaminação

2.2.1. Área de Estudo

As amostragens foram realizadas em diferentes regiões do litoral centro norte catarinense. Foram coletadas amostras na região de Florianópolis, Itajaí até o Município de Araquari, norte do estado.

Para escolha da região de amostragem foi considerada a proximidade de fontes de contaminação de origem humana e animal a corpos hídricos bem como o acesso às propriedades a serem visitadas.

2.2.2. Coleta de Amostras

Foram coletadas amostras de fezes de animais de criação (suínos, bovinos, ovinos e aves), e amostras humanas.

As amostras animais foram obtidas no Colégio Agrícola de Araquarí e em propriedades particulares na Ilha de Florianópolis. As amostras de fezes foram coletadas através de um “swab” diretamente na região retal dos animais e acondicionadas em tubos de ensaios estéreis, sob refrigeração, e levadas em no máximo 6 horas para o laboratório. Essa metodologia de coleta foi descrita como ideal por Bettelheim et al (2005), que justifica que a coleta diretamente no animal evita contaminações proveniente do ambiente e outros animais.

As amostras de fezes humanas foram solicitadas aos laboratórios de análises clínicas do Centro de Saúde da Universidade do Vale do Itajaí. Essas amostras foram recolhidas aleatoriamente e sem identificação pelos técnicos do laboratório e levadas para cultura em um período de no máximo 6 horas após a coleta.

2.2.3. Isolamento e Identificação das Cepas

As amostras de fezes humanas e de cada animal foram diretamente inoculadas em placas contendo o meio seletivo para Coliformes totais e *E. coli* - Chromocult Coliform Agar® e incubadas em estufa bacteriológica a 35-37 °C por um período de 48 horas. Após esse período selecionou-se colônias com características típicas de *E. coli* de cada placa e repicou-se novamente em meio Chromocult Coliform Agar® para se obter colônias puras (Fig. 01).

As colônias obtidas foram identificadas através de provas bioquímicas tradicionais segundo descrito por Edwards & Ewing (1972). Além da prova de Gram e motilidade se realizou os testes de indol, oxidase, H₂S, Citrato, e Lisina.

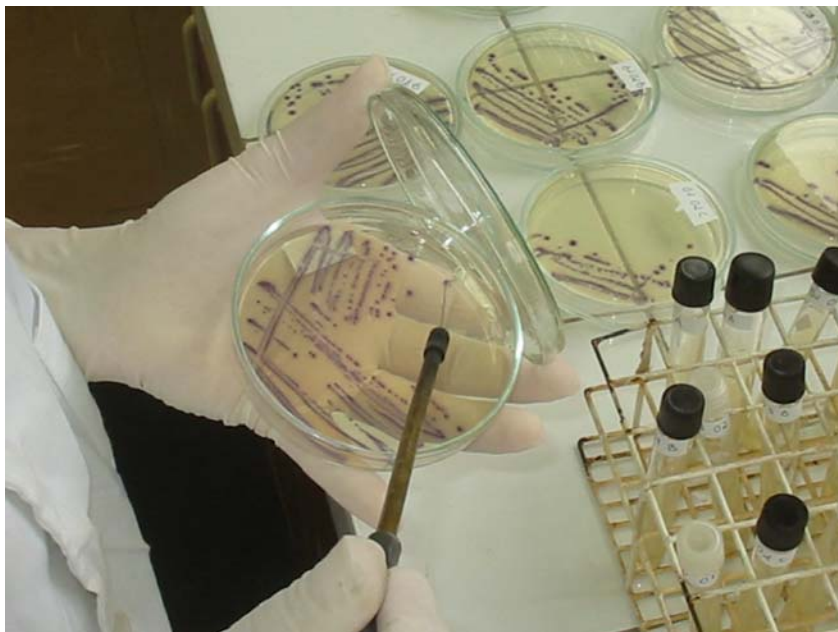


Figura 01 – Isolamento e purificação de *Escherichia coli* em Chromocult Coliform Agar®

As colônias identificadas como da espécie *Escherichia coli* foram repicadas em um tubo contendo agar nutriente e acondicionadas à temperatura ambiente.

2.2.4. Perfil Antimicrobiano

A metodologia utilizada para verificar a resistência a antibiótico, descrita por Gontijo-Filho (2001), consistiu em diluir cada uma das cepas isoladas em 1 ml de água peptonada estéril e espalhar com o auxílio de um bastão de vidro estéril sobre uma placa contendo Agar de *Mueller Hinton*® (MERCK). Sobre esse agar foram colocados discos de celulose contendo concentrações dos seguintes antibióticos: cloranfenicol (30 mcg), sulfa-trimetropim (23.75 ug + 25 ug), polimixina B (300 mcg), gentamicina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), cefalotina (30 mcg), imipenem (10 mcg), tetraciclina (30 mcg), estreptomicina (10 mcg), penicilina (10 U), eritromicina

(15 mcg) e vancomicina (30 mcg)(Fig. 02). Tais antibióticos demonstraram-se eficientes em testes de peris de resistência realizados por Harwood et al (2000); Wiggins et al (1999) e Pessanha e Gontijo-Filho (2001).

O método do disco para susceptibilidade a antibióticos é recomendado pela FDA (*Food and Drug Administration*), como sendo uma técnica altamente padronizada (Pelczar Jr. et all, 1996).



Figura 2 – Testes de sensibilidade a antibióticos, por meio de difusão em disco

As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 35-37 °C por 24 horas, aonde se identificou o padrão de inibição de crescimento bacteriológico frente a cada tipo de antibiótico. Estes padrões foram obtidos através da medida do raio do halo de inibição de crescimento bacteriano formado ao redor de cada antibiótico. (Fig. 03).



Figura 3 – Sensibilidade das cepas de *E. coli* frente a diferentes antibióticos

2.2.5. Perfil Molecular

2.2.5.1. Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o método Sílica/Tiocianato de Guanidina descrito por Boom *et al* (1990). Neste método foi diluído uma colônia pura de *Escherichia coli*, crescida por 24 horas, em 500 μ L de água ultrapura estéril em um tubo de endorff de 1.5 ml. O protocolo de extração está descrito no anexo I, pg 41.

2.2.5.2. PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) do DNA Extraído

Segundo Saiki *et al* (1988) a Reação de Polimerase em Cadeia ocorre em três etapas. Na primeira denominada “Melting” ou desnaturação, ocorre a separação da dupla fita do DNA a ser amplificado. Depois temos o anelamento ou hibridização, ligação do iniciador do “*primer*” ao DNA a ser amplificado. Finalmente a extensão, que é a polimerização propriamente dita. A temperatura de anelamento depende do DNA usado, variando de 50°C a 58°C.

Neste trabalho utilizamos a técnica denominada, 16S onde foram utilizados dois primers conhecido como F:(AGAGTTTGATCATGGCTCAG) e R:(AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA).

Utilizou-se uma alíquota de 2 µl (+/-25ng) do DNA extraído. Este foi ressuspendido em 8.66µl de água ultrapura estéril. Adicionou-se então um “mix”, composto por 2µl de tampão (10 X); 2µl de DNTP(2mM); 1,5µl de MgCl₂ (2,85 mM); 0,2 µl da Enzima Taq-Polimerase (5 u); 2µl do *Primer F* (5mM) e 2 µl do *Primer R* (5mM).

Esta mistura foi levada o um termociclador (*Mastercycle Gradient – Eppendorf*) (Fig. 4), programado com o seguinte programa: Etapa 1 - 4°C (4 minutos); Etapa 2 - 94 °C (20 min.)+ 52°C (30 min.) + 72°C (1 min.) – divididos em 30 ciclos; Etapa 3 - 72°C (2 min e 30 seg.); Etapa 4 - 10°C (infinito).



Figura 4 - Termociclador (Mastercycle gradient – eppendorf) utilizado para o PCR

2.2.5.3. Eletroforese em Gel de Agarose - Amplificação do DNA

A corrida foi realizada em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídeo a 0.5µg/L. Como tampão de corrida optou-se pelo TEB (Tris – ácido bórico – EDTA). Para cada canaleta foram colocados 5 µl do produto do PCR. Utilizou-se um marcador molecular padrão de 100 pb. A corrida ocorreu em cuba eletroforética horizontal a 70 V, 60 mA, por 1h e 30 min.

Após a corrida o gel foi visualizado através de um transluminador com lâmpada ultravioleta e fotografado por um capturador de imagem “Kodak ®”.

2.2.5.4. Corte da Amostra com as Enzimas de Restrição - RFLP

A técnica de RFLP envolve a clivagem de moléculas de DNA por enzimas de restrição, e separação por eletroforese em gel dos fragmentos gerados e sua visualização das bandas. Cada banda corresponde a um grupo de moléculas do mesmo tamanho (Arias & Infante-Malachias, 2001) .

Para este trabalho foram utilizadas as enzimas Hind III, Sal, Ecor I e MSE. O procedimento seguiu a norma descrita pelo fornecedor, no qual 3 µl do produto do PCR foram ressuspendido em 14 µl de água purificada estéril, adicionar 2 µl de tampão específico de cada enzima e 1 µl da enzima a ser utilizada. Depois de misturado, o material foi incubado por 1 hora em banho Maria a 37 °C e a separação dos fragmentos foi feita por eletroforese em gel.

2.2.5.5. Eletroforese em Gel de Agarose – Produto do RFLP

A corrida foi realizada em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo a 0.5µg/L. Como tampão de corrida foi utilizado TEB (Tris – ácido bórico – EDTA). Utilizou-se um marcador molecular padrão de 100 pb. A corrida ocorreu em cuba eletroforética horizontal a 70 V, 60 mA, por 2horas.

Depois da corrida eletroforética, o passo seguinte é a visualização dos fragmentos. Quando se tem mais de 50ng de DNA por banda, o brometo de etídeo é indicado.

Após a corrida o gel foi visualizado através de um transluminador com lâmpada ultravioleta e fotografado por um capturador de imagem “Kodak ®”.

2.3 Análise dos Dados

Os dados de indicadores de contaminação fecal foram organizados em uma planilha do Microsoft Excel-2000, onde plotou-se gráficos comparando a variação dos dois parâmetros estudados e seus respectivos limites na Legislação Brasileira.

Para os antibiogramas utilizou-se primeiramente o programa de análise de similaridade *ANOSIM*, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando o nível de significância foi menor que 5%. Posteriormente agrupou-se os dados das fontes de contaminação duas a duas onde se verificou a existência de diferenças significativas entre elas através de um *Teste-T*, com significância menor que 5 %, utilizando o Software Estatística, 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comparação dos Indicadores de Contaminação Fecal

O período de estudo mostrou-se adequado para os testes de comparação dos indicadores, onde houve grandes variações nas contagens microbiológicas, permitindo compara-las em diferentes situações.

Comparando os resultados de quantificação de *Escherichia coli* e Enterococos, com os limites exigidos pela Legislação Brasileira, foi observado, na maioria das amostras, uma correspondência nas flutuações dos dois indicadores para as áreas estudadas.

Vinay et al, (2005), estudando a qualidade de águas de rios na Índia, observou resultados semelhantes entre os indicadores Coliformes fecais e Enterococos.

Para Barra Sul, podemos observar na Fig. 05, dois grandes picos de contagem para *E. coli*. Estes picos são acompanhados pelo indicador enterococos. Mostrando neste caso um aumento da contaminação orgânica do ambiente, demonstrado por ambos.

Entretanto, observando a tabela I, para esta mesma área, podemos ver que na primeira coleta onde *E. coli* estaria abaixo do limite indicado pela legislação o grupo Enterococos aparece acima deste limite. Isso pode ocorrer devido a uma maior resistência deste grupo no meio marinho.

Poletto (2003), correlacionando as doenças veiculadas por água com indicadores, relata que enterococos é mais apropriado para avaliação de balneabilidade em água salgada. Este resultado foi observado também por Cabelli (1982) e McBride et al (1998) correlacionando casos de gastroenterite e a ocorrência de Enterococos.

Por outro lado, na última data de coleta observamos um efeito inverso, ou seja, Enterococos abaixo do limite e *E. coli* acima. Uma possível explicação para esta mudança seria relativa a alta pluviosidade neste período e o momento da

coleta. Como a resistência dos enterococos é maior no ambiente salino, quanto mais próximo do período de chuva a coleta for realizada, maior a quantidade de coliformes. Segundo Borbón & Hinojosa (1989), geralmente os períodos de maior intensidade de chuvas correspondem aos maiores valores das análises microbiológicas. Van Asperem (1998) observou em seu trabalho melhor eficiência dos Coliformes termotolerantes em prever doenças em água doce, comparando com enterococos.

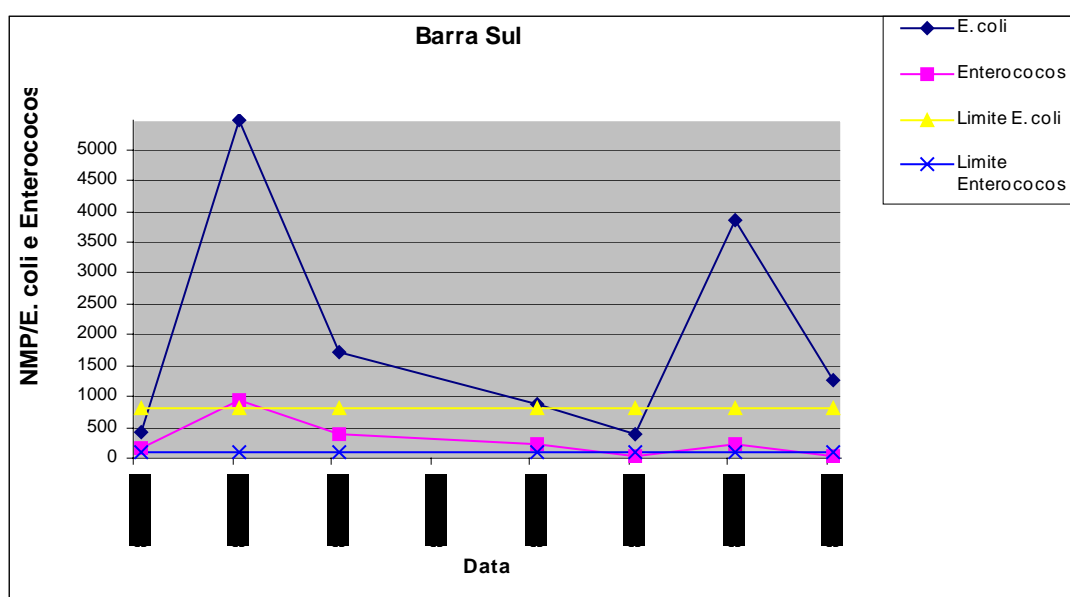


Figura 05 – Variação do Numero Mais Provável (NMP) de *E. coli* e Enterococos na Barra Sul e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira

Tabela I – Comparação entre *E. coli* e Enterococos na Barra Sul, obedecendo à exigência da Legislação Brasileira. Os valores que deram origem tabela estão no anexo II.

	<i>E. coli</i>	Enterococos
06/01/03	Próprio	Impróprio
13/01/03	Impróprio	Impróprio
20/01/03	Impróprio	Impróprio
03/02/03	Impróprio	Impróprio
10/02/03	Próprio	Próprio
17/02/03	Impróprio	Impróprio
24/02/03	Impróprio	Próprio

Para as demais coletas temos sempre uma concordância dos resultados obtidos e os limites estabelecidos pela legislação.

Para o Pontal Norte observamos que ainda existe uma pequena correlação nas variações dos dois indicadores (Fig. 06). Contudo ao verificarmos os números obtidos e seus respectivos limites (Tab. II), por duas vezes o indicador *E. coli* mostrou-se abaixo do limite e Enterococos acima. Isso pode estar indicando uma maior sensibilidade do grupo enterococos.

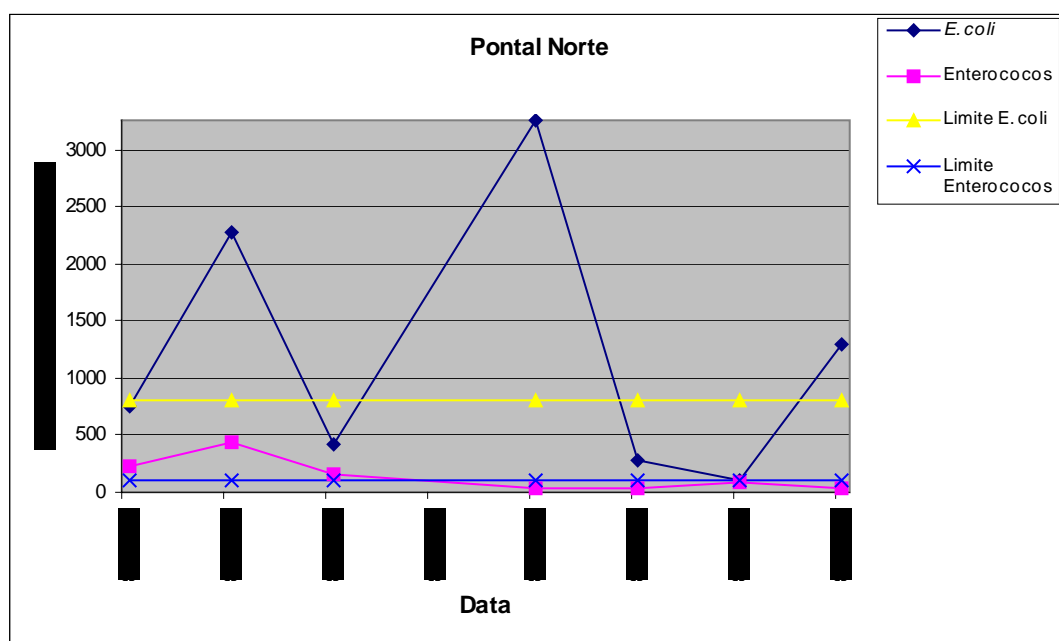


Figura 06 – Variação do Numero Mais Provável (NMP) de *E. coli* e Enterococos no Pontal Norte e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira

Tabela II – Comparação entre *E. coli* e Enterococos no Pontal Norte obedecendo, a exigência da Legislação Brasileira. Os valores que deram origem tabela estão no anexo II.

E. coli		Enterococos
06/01/03	Próprio	Impróprio
13/01/03	Impróprio	Impróprio
20/01/03	Próprio	Impróprio
03/02/03	Impróprio	Próprio
10/02/03	Próprio	Próprio
17/02/03	Próprio	Próprio
24/02/03	Impróprio	Próprio

Foi observado também um mesmo comportamento que o ponto anterior, quando na última coleta observamos novamente o inverso, ou seja *E.coli* acima do limite e Enterococos abaixo. Esses resultados podem reforçar a possível influência da chuva no aporte e sobrevivência da *E. coli* em águas doces, tendo em vista que este ponto está sob influência do Ribeirão do Marambaia.

Da mesma forma, esta inversão ocorre no dia 03/02, período em que a pluviosidade também se mostrou elevada. Este fato pode não ter sido observado na Barra Sul devido a maior diversidade de fontes de efluentes, uma vez que o Rio Camboriú recebe efluentes da cidade vizinha, saída da estação de tratamento da empresa de saneamento e de propriedades animais da região.

Para o ponto da Praça Almirante Tamandaré, parte central da praia, o grupo enterococos mostrou-se bem mais restritivo (Fig 07). Nas três primeiras coletas a bactéria *E. coli* ficou abaixo dos limites exigidos, enquanto o grupo Enterococos acima (Tab. III).

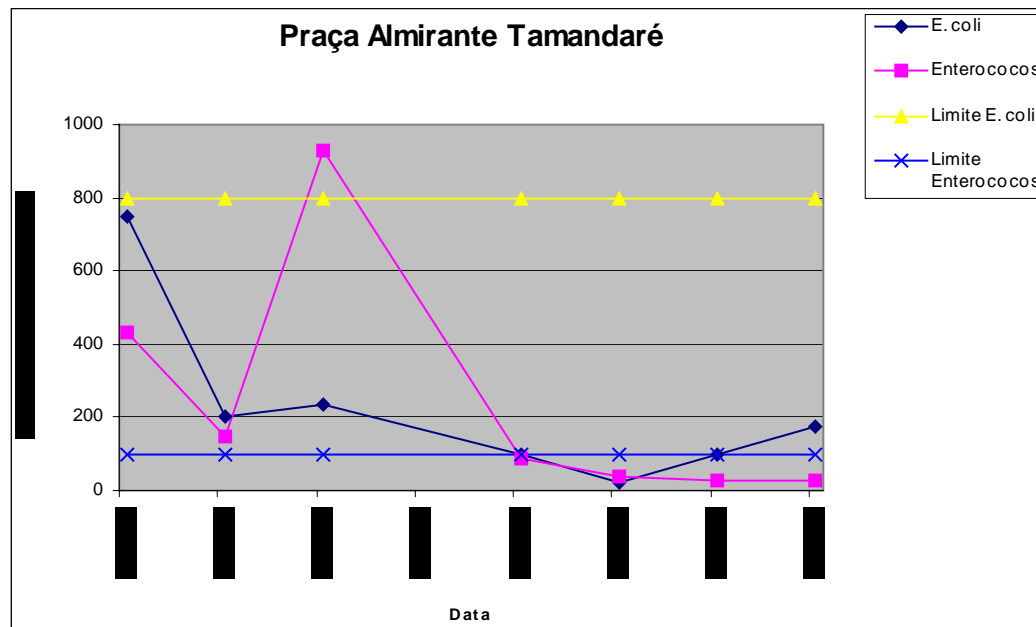


Figura 07 – Variação do Numero Mais Provável (NMP) de *E. coli* e Enterococos na Praça Almirante Tamandaré e seus respectivos limites exigidos pela Legislação Brasileira

Tabela III – Comparação entre *E. coli* e Enterococos na Praça Almirante Tamandaré, obedecendo à exigência da Legislação Brasileira. Os valores que deram origem tabela estão no anexo II.

	<i>E. coli</i>	Enterococos
06/01/03	Próprio	Impróprio
13/01/03	Próprio	Impróprio
20/01/03	Próprio	Impróprio
03/02/03	Próprio	Próprio
10/02/03	Próprio	Próprio
17/02/03	Próprio	Próprio
24/02/03	Próprio	Próprio

Nas demais coletas os dois parâmetros ficaram abaixo do limite exigido por lei. Esta característica pode ser explicada pela localização central e menor influência direta dos rios locais neste ponto. Neste caso o grupo Enterococos se apresentou como o indicador mais sensível.

Esta sensibilidade maior é descrita como positiva por Polleto (2003), onde observou melhor correlação dos enterococos com doenças veiculadas pela água na Praia Central de Balneário Camboriú.

A legislação brasileira exige que se opte por um dos indicadores para avaliar a qualidade de água. Contudo vemos neste trabalho um comportamento diferente entre eles em resposta as situações ambientais e geográfica diferentes. Neste caso temos que avaliar qual o indicador mais adequado para cada situação. Nos EUA e Comunidade Européia, são utilizados diversos indicadores ao mesmo tempo, tomando como resultado final o que se apresentar como mais restritivo (Benedict & Neumann, 2004) e (Gipperth & Elmgren, 2005). Entretanto, na legislação internacional, é necessária a determinação de todos os indicadores previstos, enquanto que na legislação nacional a realização de mais de um dos indicadores, é facultativa.

Como pudemos observar neste trabalho, as características ambientais e os processos hidrológicos alteram a eficiência dos indicadores estudados. Por se tratar de um ponto de importância na saúde pública, podemos sugerir que, até que se

obtenha um outro indicador mais adequado, utilize-se do grupo enterococos juntamente com grupo coliformes, optando pelo resultado mais restritivo.

3.2. Perfil Antimicrobiano

Trabalhos com testes de resistência a antibiótico são realizados rotineiramente com bactérias de amostras clínicas para fins terapêuticos. Contudo pouco se tem relatado sobre estes testes em amostras ambientais e animais com objetivo de identificar fontes de contaminação hídrica.

O resultados obtidos nos antibiogramas mostraram diferenças significativas entre as cepas de *E. coli* para os antibióticos testados.

Podemos observar na tabela IV, as médias do tamanho dos halos de inibição produzidos pelos antibióticos pelas cepas estudadas. Observamos maior frequência de inibição para imipenem, e cloranfenicol. Menor frequência de inibição para penicilina, vancomicina e eritromicina. Grande variação nos padrões de polimixina B, sulfa-trimetropin e tetraciclina.

Tabela IV – Médias dos raios (cm) dos halos de inibição formados pela ação dos antibióticos nas cepas isoladas.

	Imipenem IPM -10mcg	Cloranfenicol C-30mcg	Tetraciclina TE-30mcg	Gentamicina CN-10mcg	Penicilina P-10u	PolimixinaB PB-300mcg
Bezerro	0,888888889	0,80555556	0,41666667	0,438888889	0,122222222	0,327777778
Ovino	0,966666667	0,87333333	0,42	0,5	0,206666667	0,333333333
Bovino adulto	0,93	0,89	0,4	0,48	0,17	0,32
Galinha	0,95	0,95	0,17	0,43	0,21	0,35
Humano	1,516666667	0,575	1,225	0,4	0,1	0,533333333
Suíno	1	0,74	0,17	0,45	0,15	0,33
Marreco	0,93	0,66	0,31	0,4	0,13	0,31

	Vancomicina VA-30mcg	Eritromicina E-15mcg	Cefalotina KF-30mcg	Ampicilina AM-10mcg	Streptomicina S-10mcg	Sulfa Trimetripin SXT-23.75ug+25ug
Bezerro	0,033333333	0,22777778	0,38888889	0,3	0,366666667	0,561111111
Ovino	0,093333333	0,28666667	0,34	0,346666667	0,473333333	0,833333333
Bovino adulto	0,1	0,17	0,29	0,32	0,31	0,59
Galinha	0,06	0,21	0,38	0,35	0,31	0,8
Humano	0,158333333	0,10833333	0,59166667	0,25	0,208333333	0,533333333
Suíno	0,07	0,19	0,36	0,3	0,32	0,43
Marreco	0,03	0,15	0,25	0,28	0,34	0,78

Utilizando-se de um programa estatístico para análise de similaridade (Anosim), com nível de significância de 5%, observamos que amostras de origem humana apresentam características de resistência a antibióticos bem diferentes de amostras de origem animal. A figura 8 mostra o padrão de agrupamento das fontes de contaminação, considerando a resistência aos diferentes antibióticos. Observamos que as respostas obtidas mostram que existem outras diferenciações das cepas com origens diferentes, mas com sobreposição de pontos.

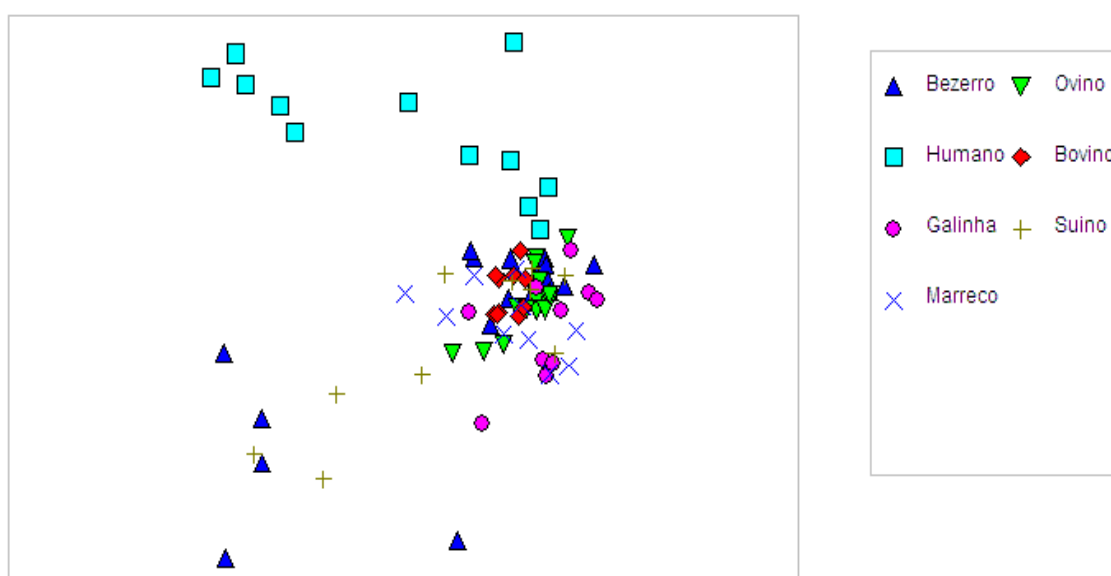


Figura 08 – Padrões de agrupamento das fontes de *E. coli* de através de respostas aos antibióticos – (programa utilizado – ANOSIM)

Para avaliar a possibilidade de diferenciar os grupos separadamente optou-se por agrupar as fontes, duas a duas, verificando a existência de diferenças entre a resistência das mesmas. Para esta análise foi utilizado o programa *Estatística Versão 5.0*, onde através do *Teste-T*, verificou-se a existência de diferenças significativas de respostas a antibióticos das cepas estudadas (Anexo III).

Com este teste obtivemos diferentes padrões de resposta para cada antibiótico. Cruzando os grupos de fontes das cepas podemos ter os antibióticos que podem ser utilizados para diferencia-las

A ampicilina só foi eficiente para diferenciar amostras humanas de bovinas. Para os demais casos não apresentou resultados significativos.

Como no teste anterior, amostras de origem humana mostraram-se com um perfil de resistência bem diferente daquelas de origem animal, apresentando uma maior quantidade de antibióticos capaz de diferenciá-las. As cepas de origem humanas foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados

Comparando as cepas provenientes de bezerros e ovinos, os antibióticos que apresentaram melhor eficiência para diferenciação, foram a penicilina e sulfatrimetropin. As cepas dos bezerros apresentaram menor sensibilidade do que as de ovinos para estes dois antibióticos.

Entre cepas de bezerros e bovinos adultos somente o antibiótico cefalotina apresentou diferenciação, sendo as amostras isoladas de bezerros mais sensíveis do que aquelas de animais adultos. Esta alta similaridade pode ser atribuída por pertencerem ao mesmo grupo animal, só diferenciado pela idade.

Entre cepas de bezerros e humanos, obteve-se uma grande diferenciação, sendo que somente vancomicina e ampicilina não apresentaram respostas significativas. *E. coli* proveniente de bezerros demonstraram menor sensibilidade a imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina, enquanto amostras humanas apresentaram menor sensibilidade a eritromicina, estreptomicina e sulfatrimetropin.

Cepas isoladas de bezerro e galinha tiveram diferenciação por dois antibióticos, tetraciclina e penicilina. Tetraciclina inibiu mais o crescimento de cepas à partir de fezes de bezerros enquanto penicilina inibiu mais o crescimento de cepas isoladas de fezes de galinha.

E. coli de bezerros e marrecos tiveram somente a cefalotina como diferenciador, sendo que para cepas isoladas de bezerros houve maior inibição do crescimento bacteriano.

Entre bezerros e suínos, as cepas foram diferenciadas pela tetraciclina, onde os bezerros apresentaram maior sensibilidade.

Entre cepas bacterianas de ovinos e humanos, obteve-se novamente uma grande diferenciação, sendo que somente vancomicina e ampicilina não apresentaram respostas positivas. *E. coli* proveniente de ovinos demonstraram menor sensibilidade a imipenem, tetraciclina, polimixina B e cefalotina, enquanto

amostras humanas apresentaram menor sensibilidade a cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, estreptomicina e sulfa-trimetropin.

Para cepas de ovinos e bovinos, tivemos os antibióticos eritromicina, estreptomicina e sulfa-trimetropin inibindo mais o crescimento de amostras ovinas.

Entre ovinos e suínos as cepas foram diferenciadas pela tetraciclina, eritromicina, estreptomicina e sulfa-trimetropin, sendo que a maior sensibilidade à todos os antibióticos foi apresentado pelas cepas ovinas.

Comparando *E. coli* entre ovinos e galinhas, obteve-se como diferenciadores os antibióticos tetraciclina, gentamicina, eritromicina e estreptomicina. Novamente todos eles inibiram mais o crescimento das cepas isoladas dos ovinos.

Entre cepas de ovinos e marrecos tivemos uma maior inibição das cepas isoladas dos ovinos pelos antibióticos cloranfenicol, gentamicina, penicilina, eritromicina e estreptomicina.

Podemos observar que na maioria dos casos as cepas de origem ovina são sempre mais sensíveis aos antibióticos que as demais.

Comparando amostras bacterianas de origem humana e bovina observamos uma maior sensibilidade das humanas para imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina. Uma menor sensibilidade para gentamicina, ampicilina e estreptomicina.

Entre cepas bacterianas de origem humana e de galinha, os antibióticos que se destacaram foram Imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina com maior inibição para humana e cloranfenicol, e penicilina para cepas de origem de galinha.

Entre amostras originadas de humanos e marrecos notou-se um comportamento igual às amostras isoladas de humanos e suínos. Nestes dois casos as cepas de origem humanas foram mais sensíveis a imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina. A menor sensibilidade neste caso foi observada para o antibiótico estreptomicina

Gales et al (1997), observaram elevada sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de amostras clínicas em hospitais de São Paulo, ao antibiótico Imipenem.

O mesmo foi observado neste trabalho, podendo este antibiótico ser utilizado para diferenciar cepas humanas de todas as outras.

Para cepas isoladas de bovinos e galinha tivemos os antibióticos tetraciclina e cefalotina como diferenciadores. Neste caso, bovinos são mais sensíveis a tetraciclina enquanto galinhas a cefalotina.

Para bovinos e suínos os antibióticos que se destacaram foram imipenem e tetraciclina. Cepas bovinas foram mais sensíveis à tetraciclina e suínas a imipenem.

Entre bovinos e marrecos tivemos uma maior sensibilidade dos bovinos aos antibióticos cloranfenicol e gentamicina.

Bettelheim et al (2005) observaram alta sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de bovinos ao antibiótico tetraciclina. Esta sensibilidade foi observada nos testes realizados, mas não foi possível a diferenciação das cepas neste trabalho pois vários outros grupos animais apresentaram cepas sensíveis a este antibiótico.

Para cepas isoladas de galinhas e suínos, somente o cloranfenicol foi eficiente para diferenciar, sendo que as cepas originadas de galinhas apresentaram maior sensibilidade.

Entre galinha e marreco, cloranfenicol e cefalotina podem ser utilizados na diferenciação. Cepas isoladas de galinha se mostraram mais sensíveis aos dois antibióticos.

E somente cefalotina diferenciou suíno de marreco, sendo suínos mais sensíveis.

Como visto anteriormente, tivemos uma grande diferenciação dos perfis de resistência entre amostras animais e humanas. Esse resultado é de grande importância para detectarmos fontes de poluição fecal.

Não obtivemos padrões de resistência que separassem os grupos de animais domésticos, sugere-se a utilização de outros antibióticos em trabalhos posteriores. Este resultado sugere que com o aumento gradativo da resistência a diferentes antibióticos pelas cepas bacterianas, pode inviabilizar a diferenciação de cepas bacterianas por esta metodologia.

3.3. Perfil Molecular

O desenvolvimento de técnicas da reação da cadeia de polimerase (PCR), permite a detecção de seqüências gênicas de microorganismos, tornando possível estudos de diferenciação de cepas geneticamente diferentes (Valadares-Inglis & Melo, 1998).

A metodologia de extração e amplificação do DNA utilizada, apresentou-se positiva para 100% das cepas (Fig.9). Com o produto de amplificação testado buscou-se uma diferenciação a partir do corte com enzimas de restrição - RFLP.



Figura 9 - Produtos obtidos através da amplificação do gene de 16S de *Escherichia coli*, pela reação em cadeia pela polimerase.

As enzimas de restrições utilizadas (Hind III, Sal, Ecor I e MSE), separaram fragmentos específicos do DNA amplificado. Estes fragmentos apesar de apresentaram diferenciações, não permitiram identificar padrões para as diferentes fontes (fig.10).

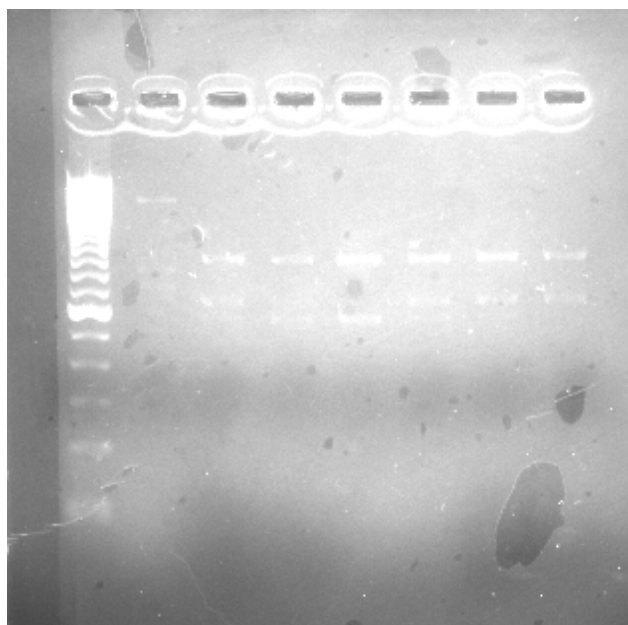


Figura 10 – Produtos obtidos através de do corte com enzimas específicas.

4. CONCLUSÕES

. O grupo enterococos se mostrou mais restritivo para o ambiente marinho comparado com a bactéria *E. coli*, quando foram avaliados os dois grupos de indicadores de contaminação fecal frente aos limites impostos pela Legislação Brasileira.

. Em áreas sob influência de água doce (rios e córregos), a bactéria *E. coli* demonstrou ser mais abundante que o grupo enterococos, sendo neste caso mais restritiva.

. Sugere-se uma reavaliação na legislação brasileira quando ao uso de um só indicador, aconselhando a utilização obrigatória dos dois indicadores de contaminação fecal para o litoral brasileiro.

. A técnica de sensibilidade a antibióticos apresentou-se eficiente na diferenciação entre cepas de *E. coli* de origem humana e animais.

. Ampicilina foi o antibiótico de menor poder discriminatório, sendo somente eficiente para diferenciar amostras humanas de bovinas.

. Entre cepas de bezerros e humanos, obteve-se uma grande diferenciação, sendo que somente vancomicina e ampicilina não apresentaram respostas significativas.

. Entre cepas de ovinos e humanos, obteve-se uma diferenciação eficiente, sendo que somente vancomicina e ampicilina não apresentaram respostas positivas.

. Comparando amostras humanas de bovinas observamos uma maior sensibilidade das humanas para imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina.

. Entre cepas humanas e de galinha, os antibióticos que se destacaram foram Imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina com maior inibição para humanas e cloranfenicol, e penicilina para galinha.

. Entre amostras humanas e marreco tivemos um comportamento igual às amostras entre humanos e suínos. Nestes dois casos as cepas de origem humanas foram mais sensíveis a imipenem, tetraciclina, polimixina B, vancomicina e cefalotina.

. Para diferenciar cepas de Bezerros e Ovinos os antibióticos que apresentaram melhor eficiência foram penicilina e sulfa-trimetropin.

. Entre cepas de bezerros e bovinos adultos somente o antibiótico cefalotina apresentou diferenciação.

. Cepas de Bezerro e galinha tiveram diferenciação por dois antibióticos, tetraciclina e penicilina.

. *E. coli* de Bezerros e marrecos tiveram somente a cefalotina como diferenciador, sendo que para cepas de bezerro houve maior inibição.

. Entre bezerros e suínos as cepas foram diferenciadas pela tetraciclina, onde os bezerros apresentaram maior sensibilidade.

. Entre ovinos e suínos as cepas foram diferenciadas pela tetraciclina, eritromicina, estreptomicina e sulfa-trimetropin.

Comparando *E. coli* entre ovinos e galinhas, temos com diferenciadores os antibióticos tetraciclina, gentamicina, eritromicina e estreptomicina.

. Entre cepas de ovinos e marrecos tivemos uma maior inibição das cepas dos ovinos pelos antibióticos cloranfenicol, gentamicina, penicilina, eritromicina e estreptomicina.

. Para cepas isoladas de bovinos e galinha tivemos os antibióticos tetraciclina e cefalotina como diferenciadores.

Para bovinos e suínos os antibióticos que se destacaram foram imipenem e tetraciclina.

. Entre bovinos e marrecos tivemos uma maior sensibilidade dos bovinos aos antibióticos cloranfenicol e gentamicina.

. Para cepas de galinhas e suínos, somente o cloranfenicol foi eficiente para diferenciar, sendo que as cepas de galinhas apresentaram maior sensibilidade.

. Entre galinha e marreco, cloranfenicol e cefalotina podem ser utilizados na diferenciação.

. Somente cefalotina diferenciou suíno de marreco, sendo suínos mais sensíveis.

. A metodologia de extração de DNA utilizada no trabalho se apresentou adequada para bactéria *E. coli*.

. As técnica de RFLP utilizando-se a PCR -16S, diferenciou cepas de *E. coli*, mas não sua origem

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA – American Public Health Association, American Water Works association and Water Enviroment Federation. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 ed. Washinton, D.C.: American Public Health Association.

BAUDISOVÁ, D. 1997. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicador of faecal pollution. Wather Science Technology. V. 35, n. 11-12, 333-336.

BENEDICT, R. T. & NEUMANN, C. M. 2004. Assessing Oregon's twenty coastal beach areas for recreational water quality standards. Marine Pollution Bulletin. V.49. p. 624-629.

BETTELHEIM, K. A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R. A.; KRAUSE, D. O. & McSWEENEY, C. S. 2005. The diversity of *Escherichia coli* serotypes in cattle faeces. Journal of Applied Microbiology. 98, p. 699-709.

BOOM, R.; SOL, C.J.S.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. & NOORDAA-VAN DER, J. 1990. Rapid and simple meted for purification of nucleis acids. J. Clin. Microbiol. 28:843-850.

BORBÓN, M. V. O. & HINOJOSA, F. D. 1989. Contaminación fecal en sedimentos superficiales de la Bahia de Todos Santos, Baja California. Ciências Marinas. v.15, n.1, p. 47-62.

BRISSE, S. & van DUIJKEREN, E. 2005. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. Veterinary Microbiology. 105. p. 307-312.

CABELLI, V.J. 1982. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. American journal of Epidemiology. V. 115, n. 4, p. 606-616.

CAMPOS, L.C. & TRABULSI, L.R.1999. **Microbiologia**. Atheneu. 3 Ed. p. 215 – 228.

CAPRIOLI, A.; NIGRELLI, R. G. ; ZAVANELLA, M., BLANDO, A. M.; MINELLI, F. & DONELLI, G. 1993. Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. Veterinary Record. 133 (25): 323-324.

CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTTA, P.; SASIPREEYAJAN, J. & SVENSON, S. B. 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Veterinary Microbiology, 80, p. 75-83.

CONAMA. 2002. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274 de novembro de 2000. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/frlegis.htm> Acesso em 03 de maio 2002.

DIONISIO, L. P. C.; RHEINHEIMER, G. & BORREGO, J. J. 2000. Microbiological pollution of Ria Formosa (South of Portugal). Marine Pollution Bulletin. V.4, n.2, p. 186-193.

EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. 1972. **Identification of Enterobacteriaceae**. Burgess Publ. Co., Minneapolis, 3 ed.

FERGUNSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J. & STEVENSON, I. M. 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. Water Research. v.30, n.9, p. 2042-2054.

FRERE, E.; GANDINI, P. & MARTINEZ PECK, R. 2000. Gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) como vector potencial de patógenos, en la Costa Patagónica. Hornero, 15, p. 93-97.

FUNGARO, M.H.P. & VIEIRA, M.L.C. 1998. Aplicação da PCR em ecologia molecular, In: Melo, I.S. & Azevedo, J. L. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA-CNPMA. p. 205-227.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F. & MONTAGNA, M. T. 2000. Comparative survival of faecal contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as a effective indicator of human pollution. Marine Pollution Bulletin. v.4, n. 8, p. 697-700.

GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARETTA, M. & SADER, H.S. 1997. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenems contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. Revista Ass. Méd. Brasil. 43(2): 137-144.

GAUTHIER, M. J. 1980. Poluiciones bacterianas en el medio marino. In: PÉRES, J. M. **La poluicion da las águas marinas**. Omega, p. 127-141.

GERHARD, R. **Microbiologia de la águas**. 1987. Acríbia. P. 233-251.

GIPPERTH, L. & ELMGREN, R. 2005. Adaptive Coastal planning and the European Union's Water framework directive: A Sweduh pespective. Ambio. 34 (2).p. 157-162.

GIRÃO, M.D.; BANDO, S.Y.; GIRÃO, V.B.C.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FRACALANZZA, S.E.L.; TRABULSI, L.R. & MONTEIRO-NETO, V. 1999. Characterization of typical and atypical enteropatogenic *Escherichia coli* (EPEC) stains of the classical O55 serogroup by RAPD analysis. Revista de Microbiologia, 30, p. 365-368.

HARWOOD, V. J.; WHITLOCK, J. & WITHINGTON, V. 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 66, n. 9, p. 3698-3704.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2005. Banco de Dados. Disponível em <<http://ibge.gov.br>> Acesso em: 01 de março de 2005.

ISMAILI, A.; PHILIPOTT, D.J., DYTOC, M.T. & SHERMAN, P.M. 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection Immunity*. 1995. *Infection Immunity*. 63(9): 3316- 3326.

KAY, D. & FLEISHER, J. M. 1994. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: Results from randomized exposure. *Lancet*. v.344, p. 905-909.

KLEIN, A.H.F.& MENEZES, J.T. 2000. Beach Morphodynamics and Profile Sequence for a Headland Bay Coast. *Journal of Coastal Research*, v.17, n.4, p. 812-835.

LATEEF, A.; OLOKE, J. K. & GUEGUIMKANA, E. B. 2005. The prevalence of bacterial resistance in clinical, food, water and some environmental samples in southwest Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*. 100. p. 59-69.

McBRIDE, G.B.1998. Health effects of marine bathing in New Zealand. *International Journal of Environmental Health Research*. V. 8, p. 173-189.

PARVEEN, S.; HODGE, N.C.; STALL, R.E.; FARRAH, S.R. & TAMPLIN, M.L. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Wat. Res.*, v. 35, n. 2. P. 379-386.

PELCZAR Jr, J. M; CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R. 1996. **Microbiologia: conceitos e aplicações**.. São Paulo: MAKRON books. V.2. p. 222-248.

PESSANHA, R.P. & GONTIJO FILHO, P.P. 2001. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. V53, n.1, p.

POLETO, T.V. 2003. Associação entre os indicadores microbiológicos de contaminação fecal e a ocorrência de doenças veiculadas por água do mar em Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. Monografia (Graduação em Oceanografia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, universidade do vale do Itajaí – Itajaí.

RADU, S.; ELHADI, N.; HASSAN, Z.; RUSUL, G.; LIHAN, S.; FIFADARA, N.; YUHERMAN & PURWATI, E. 1998. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. FEMS Microbiology Letters, 165, p.139-143.

RINCE, A.; FLAHAUT, S. & AUFRAY, Y.2000. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology. Caen, France, v. 55, p. 87-91.

RYCKE, J.; GUILLOT, J.F. & BOIVIN, R. Cytotoxins in Non-Enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. 1987. Veterinary Microbiology. 15(2): 137-150.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORM, G. T.; MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. Science. N.239, p.487-491.

SCHETTINI, C.A.F.; CARVALHO, J.L.B. & JABOR, P. 1996. Comparative Hydrology and suspended matter distribution of four estuaries in Santa Catarina State – Southern Brazil. Proceedings of Workshop on Comparative Studies of Temperate Coast Estuaries. p. 29-32.

SECRETARIA DE TURISMO DE BALNEÁRIO CAMBORIÚ. 2003. Praias. Disponível em <[http:// www.secturbc.com.br](http://www.secturbc.com.br)> Acesso em 30 maio 2003.

SILVA, A. Z.; RÖRIG, L. R. & RESGALLA JÚNIOR, C. 2000. Determinação do efeito do esgoto bruto e efluente da estação de tratamento de esgoto de Balneário Camboriú (SC) sobre o crescimento de *Skeletonema costatum* (Baccillariophyceae). In: ESPÍNDOLA, E. L. G. Ecotoxicologia: perspectiva para o século XXI. São Carlos: Rima, p. 427-440.

SOARES, J. B. & MAIA, A.C.F. 1999. **Água – Microbiologia e Tratamento**. UFC Edições. Fortaleza. 216p.

TERNES, C.F.; KUROSHIMA, K.N. & BARREIROS, M.A.B. 2000. Avaliação da qualidade da água do rio e da enseada de Camboriú – SC, durante os últimos 4 anos (1997-2000). Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia. Itajaí. CTTMar. p. 233 – 235.

TOMASSI, L. R. 1982. **Poluição marinha no Brasil, uma síntese**. Ciência e Cultura. São Paulo, v.34, n.3, p.325-332.

TRABULSI, L. R. & TOLEDO, M. R. F. 1999. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu,. 586 p.

TURNER, S.J.; LEWIS, G.D. & BELLAMY, A.R. 1997. Detection of sewage-derived *Escherichia coli* in a rural stream using multiplex PCR and automated DNA detection. *Water Science Technology*. v. 35,n 11-12, p. 337-342.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAME. 2003. Global State of the Environment. **Report. Global Environment Outlook – 1**. Disponível em: <http://www.grida.no/geo1/exsum/ex3.htm> Acesso em 17 out. 2003.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. 2000. Office of Water. Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria – 1986. Disponível em: <http://www.epa.gov/ost/standards/bactéria/bactéria.pdf> acesso em 15 setembro 2000.

VALADARES-INGLIS, M. C. & MELO, I. S. 1998. Métodos de extração de DNA e sua Aplicação em estudos Genéticos e Ecológicos, *In* MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. ENBRAPA – CNPMA. p. 187-227.

VAN ASPEREN, I.A. 1998. Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution on fresh waters. *International Journal of Epidemiology*. V. 27, p. 309-315.

VINAY, S. B.; KRISHNA, G.; SANJAY, D. & RUDRA, D. T. 2005. Bacterial indicators of faecal contamination of the Gangetic river system right at its source. *Ecological Indicators*. 5. p. 49-56.

VOLK, W.A.; GEGHARDT, B.M.; HAMMARSKJÖLD, M. & KADNER, R.J. 1995. **Medical Microbiology**. Lippincott-Raven. 3 Ed. 726p.

VON SPERLING, M. 1996. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. In **Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias**. SEGRAC. Universidade Federal de Minas Gerais. V. 1. 243p.

WIGGINS, B.A.; ANDREWS, R.W.; CONWAY, R.A.; CORR, C.L.; DOBRATZ, E.J.; DOUGHERTY, D.P.; EPPARD, J.R.; KNUPP, S.R.; LIMJOCO, M.C.; METTENBURG, J.M.; RINEHARDT, J.M.; SONSINO, J.; TORRIJOS, R.L. & ZIMMERMAN, M. E. 1999. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 65, n. 8, p. 3483-3486.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo de Extração do DNA de *E. coli*

Fase 1

1. 500 µL de amostra
2. 1 % de SDS (dodecil sulfato de sódio) – 5 µL
3. 0.2 mg/mL de proteinase K (0.1 mg – 5 µL)
4. Homogeneizar em vórtex – 10 segundos
5. Banho Maria a 56°C – 30 minutos

Fase 2

1. 500 µL da amostra obtida na da fase 1
2. 10 µL de sílica hidratada
3. 900 µL de solução L6
4. Homogeneizar em vórtex
5. Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente (aprox. 25°C)
6. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
7. Desprezar o sobrenadante
8. Adicionar 500 µL de solução L2
9. Homogeneizar em vórtex
10. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
11. Desprezar o sobrenadante
12. Adicionar 500 µL de solução L2
13. Homogeneizar em vórtex
14. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
15. Desprezar o sobrenadante
16. Adicionar 1 ml de etanol a 70%
17. Homogeneizar em vórtex
18. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
19. Desprezar o sobrenadante
20. Adicionar 1 ml de etanol a 70%

21. Homogeneizar em vórtex
22. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
23. Desprezar o sobrenadante
24. Adicionar 1 ml de acetona P.A.
25. Homogeneizar em vórtex
26. Centrifugar a 10.000 RPM – 30 segundos
27. Desprezar o sobrenadante
28. Secar o pellet em estufa a 37°C por 15 minutos com tubo aberto
29. Adicionar 30 µL de água MilliQ Autoclavada
30. Homogeneizar em vórtex
31. Banho Maria a 56 °C por 15 minutos
32. Homogeneizar em vórtex
33. Centrifugar a 10.000 RPM – 2 minutos
34. Recolher o sobrenadante
35. Adicionar 20 µL de água MilliQ Autoclavada
36. Homogeneizar em vórtex
37. Banho Maria a 56 °C por 15 minutos
38. Homogeneizar em vórtex
39. Centrifugar a 10.000 RPM – 2 minutos
40. Recolher o sobrenadante

Soluções

L6 –

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 ml de TRIS-HCL 0.1 M pH 6.4
- 22 mL de EDTA 0.2 M pH 8,0
- 2.6 g de Triton X 100

L2 –

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCL 0,1 M pH 6,4

Anexo II - Resultados Obtidos das análises microbiológicas em três pontos da praia de balneário Camboriú.

Número Mais Provável (NMP) de <i>Escherichia coli</i>/ 100 ml de água			
	Barra Sul	Praça Tamandaré	Pontal Norte
06/01/03	430	750	750
13/01/03	5.475	204	2282
20/01/03	1.725	233	428
03/02/03	889	98	3.255
10/02/03	382	20	275
17/02/03	3.873	97	98
24/02/03	1.259	175	1.301

Número Mais Provável (NMP) de <i>Enterococos</i>/ 100 ml de água			
	Barra Sul	Praça Tamandaré	Pontal Norte
06/01/03	150	430	230
13/01/03	930	150	430
20/01/03	390	930	150
03/02/03	230	90	30
10/02/03	40	40	30
17/02/03	230	30	90
24/02/03	40	30	40

ANEXO III –Teste-T, utilizado para certificar a existência de diferenças significativas de respostas a antibióticos das cepas estudadas – Programa Estatística.

Bezerros e ovinos

	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	0,966667	-1,00105	31	0,324551	18	15	0,181137	0,263674	2,118953	0,142906
Cloranfenicol	0,805556	0,873333	-1,02052	31	0,315381	18	15	0,215495	0,153375	1,974081	0,204491
Tetraciclina	0,416667	0,420000	-0,05393	31	0,957338	18	15	0,228164	0,077460	8,676471	0,000193
Gentamicina	0,438889	0,500000	-0,95308	31	0,347922	18	15	0,245282	0,037796	42,114379	0,000000
Penicilina	0,122222	0,206667	-3,00386	31	0,005237	18	15	0,087820	0,070373	1,557315	0,407642
Polimixina B	0,327778	0,333333	-0,20328	31	0,840245	18	15	0,089479	0,061721	2,101716	0,166488
Vancomicina	0,033333	0,093333	-1,31339	31	0,198691	18	15	0,048507	0,186956	14,854762	0,000001
Eritromicina	0,227778	0,286667	-1,57753	31	0,124824	18	15	0,122741	0,083381	2,166935	0,150081
Cefalotina	0,388889	0,340000	1,01042	31	0,320114	18	15	0,132349	0,145406	1,207036	0,703799
Ampicilina	0,300000	0,346667	-0,60737	31	0,548029	18	15	0,235147	0,199523	1,388967	0,540455
Estreptomicina	0,366667	0,473333	-1,55770	31	0,129457	18	15	0,237635	0,127988	3,447332	0,023869
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,833333	-2,556386	31	0,015696	18	15	0,388267	0,149603	6,735711	0,000817

Bezerro e Humano

	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	1,516667	-11,19063	28	0,000000	18	12	0,181137	0,083485	4,707587	0,012393
Cloranfenicol	0,805556	0,575000	1,64670	28	0,110799	18	12	0,215495	0,536190	6,191063	0,000936
Tetraciclina	0,416667	1,225000	-8,14108	28	0,000000	18	12	0,228164	0,316587	1,925270	0,217817
Gentamicina	0,438889	0,400000	0,53561	28	0,596457	18	12	0,245282	0,060302	16,544935	0,000035
Penicilina	0,122222	0,100000	0,56569	28	0,576113	18	12	0,087820	0,127920	2,121726	0,158469
Polimixina B	0,327778	0,533333	-7,23397	28	0,000000	18	12	0,089479	0,049237	3,302696	0,048857
Vancomicina	0,033333	0,158333	-5,94366	28	0,000002	18	12	0,048507	0,066856	1,899621	0,227131
Eritromicina	0,227778	0,108333	2,38587	28	0,024042	18	12	0,122741	0,150504	1,503550	0,435668
Cefalotina	0,388889	0,591667	-3,75809	28	0,000801	18	12	0,132349	0,162135	1,500763	0,437668
Ampicilina	0,300000	0,475000	-0,85114	28	0,401914	18	12	0,235147	0,830252	12,466393	0,000009
Estreptomicina	0,366667	0,208333	2,11562	28	0,043403	18	12	0,237635	0,124011	3,671979	0,033007
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,533333	0,1662302	28	0,86917	18	12	0,388267	0,528004	1,849319	0,246614

Bezerro e Bovinos Adultos											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	0,930000	-0,66501	26	0,511900	18	10	0,181137	0,094868	3,645606	0,053419
Cloranfenicol	0,805556	0,890000	-1,16482	26	0,254669	18	10	0,215495	0,099443	4,695968	0,023017
Tetraciclina	0,416667	0,400000	0,22165	26	0,826315	18	10	0,228164	0,081650	7,808824	0,003588
Gentamicina	0,438889	0,480000	-0,51654	26	0,609846	18	10	0,245282	0,063246	15,040850	0,000260
Penicilina	0,122222	0,170000	-1,58376	26	0,125338	18	10	0,087820	0,048305	3,305322	0,072662
Polimixina B	0,327778	0,320000	0,25782	26	0,798575	18	10	0,089479	0,042164	4,503676	0,026566
Vancomicina	0,033333	0,100000	-1,69031	26	0,102925	18	10	0,048507	0,156347	10,388889	0,000051
Eritromicina	0,227778	0,170000	1,41898	26	0,167781	18	10	0,122741	0,048305	6,456583	0,007353
Cefalotina	0,388889	0,290000	2,23648	26	0,034116	18	10	0,132349	0,056765	5,436105	0,013763
Ampicilina	0,300000	0,320000	-0,25909	26	0,797609	18	10	0,235147	0,078881	8,886555	0,002175
Estreptomicina	0,366667	0,310000	0,71529	26	0,480803	18	10	0,237635	0,099443	5,710509	0,011530
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,59	-0,218875	26	0,828457	18	10	0,388267	0,196921	3,887578	0,043409

Bezerro e Galinha											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	0,950000	-0,89299	26	0,380056	18	10	0,181137	0,158114	1,312418	0,696666
Cloranfenicol	0,805556	0,950000	-2,02024	26	0,053773	18	10	0,215495	0,084984	6,429864	0,007467
Tetraciclina	0,416667	0,170000	2,74873	26	0,010732	18	10	0,228164	0,226323	1,016333	1,000000
Gentamicina	0,438889	0,430000	0,11039	26	0,912949	18	10	0,245282	0,082327	8,876567	0,002185
Penicilina	0,122222	0,210000	-2,41884	26	0,022870	18	10	0,087820	0,099443	1,282203	0,628938
Polimixina B	0,327778	0,350000	-0,58509	26	0,563531	18	10	0,089479	0,108012	1,457143	0,481445
Vancomicina	0,033333	0,060000	-1,06904	26	0,294875	18	10	0,048507	0,084327	3,022222	0,047507
Eritromicina	0,227778	0,210000	0,43044	26	0,670422	18	10	0,122741	0,056765	4,675456	0,023367
Cefalotina	0,388889	0,380000	0,17865	26	0,859596	18	10	0,132349	0,113529	1,359026	0,655194
Ampicilina	0,300000	0,350000	-0,60945	26	0,547516	18	10	0,235147	0,143372	2,689984	0,133648
Estreptomicina	0,366667	0,310000	0,67759	26	0,504020	18	10	0,237635	0,152388	2,431748	0,176580
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,8	-1,640846	26	0,112873	18	10	0,388267	0,329983	1,384454	0,633654

Bezerro e suíno											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	1	-1,923405	26	0,065444	18	10	0,181137	0	0	1
Cloranfenicol	0,805556	0,740000	0,69352	26	0,494133	18	10	0,215495	0,279682	1,684448	0,338981
Tetraciclina	0,416667	0,170000	2,81212	26	0,009240	18	10	0,228164	0,211082	1,168403	0,842220
Gentamicina	0,438889	0,450000	-0,13648	26	0,892492	18	10	0,245282	0,097183	6,370242	0,007729
Penicilina	0,122222	0,150000	-0,77251	26	0,446780	18	10	0,087820	0,097183	1,224576	0,685965
Polimixina B	0,327778	0,330000	-0,06827	26	0,946096	18	10	0,089479	0,067495	1,757532	0,391816
Vancomicina	0,033333	0,070000	-1,49161	26	0,147837	18	10	0,048507	0,082327	2,880556	0,057745
Eritromicina	0,227778	0,190000	0,88420	26	0,384691	18	10	0,122741	0,073786	2,767107	0,123316
Cefalotina	0,388889	0,360000	0,60446	26	0,550775	18	10	0,132349	0,096609	1,876751	0,337828
Ampicilina	0,300000	0,300000	0,00000	26	1,000000	18	10	0,235147	0,169967	1,914027	0,322726
Estreptomicina	0,366667	0,320000	0,57630	26	0,569371	18	10	0,237635	0,122927	3,737024	0,049339
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,430000	0,79000	26	0,436675	18	10	0,388267	0,476212	1,504314	0,447704

Bezerro e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,888889	0,930000	-0,59469	26	0,557192	18	10	0,181137	0,163639	1,225287	0,781469
Cloranfenicol	0,805556	0,660000	1,76755	26	0,088872	18	10	0,215495	0,195505	1,214945	0,792190
Tetraciclina	0,416667	0,310000	1,20303	26	0,239807	18	10	0,228164	0,218327	1,092143	0,930622
Gentamicina	0,438889	0,400000	0,49235	26	0,626604	18	10	0,245282	0,047140	27,073529	0,000022
Penicilina	0,122222	0,130000	-0,21833	26	0,828875	18	10	0,087820	0,094868	1,166949	0,747486
Polimixina B	0,327778	0,310000	0,60335	26	0,551502	18	10	0,089479	0,031623	8,006536	0,003260
Vancomicina	0,033333	0,030000	0,17448	26	0,862836	18	10	0,048507	0,048305	1,008403	1,000000
Eritromicina	0,227778	0,150000	1,62882	26	0,115409	18	10	0,122741	0,117851	1,084706	0,939676
Cefalotina	0,388889	0,250000	3,16053	26	0,003972	18	10	0,132349	0,052705	6,305882	0,008025
Ampicilina	0,300000	0,280000	0,26173	26	0,795594	18	10	0,235147	0,063246	13,823529	0,000369
Estreptomicina	0,366667	0,340000	0,34755	26	0,730977	18	10	0,237635	0,051640	21,176471	0,000062
Sulfa-Trimetropim	0,561111	0,780000	-1,53953	26	0,135758	18	10	0,388267	0,301109	1,662702	0,441766

Ovino e Humano											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,966667	1,516667	-6,92935	25	0,000000	15	12	0,263674	0,083485	9,975155	0,000506
Cloranfenicol	0,873333	0,575000	2,06110	25	0,049839	15	12	0,153375	0,536190	12,221660	0,000047
Tetraciclina	0,420000	1,225000	-9,54083	25	0,000000	15	12	0,077460	0,316587	16,704545	0,000007
Gentamicina	0,500000	0,400000	5,27046	25	0,000019	15	12	0,037796	0,060302	2,545455	0,102769
Penicilina	0,206667	0,100000	2,75780	25	0,010717	15	12	0,070373	0,127920	3,304196	0,038553
Polimixina B	0,333333	0,533333	-9,12871	25	0,000000	15	12	0,061721	0,049237	1,571429	0,456601
Vancomicina	0,093333	0,158333	-1,14352	25	0,263654	15	12	0,186956	0,066856	7,819855	0,001567
Eritromicina	0,286667	0,108333	3,91116	25	0,000622	15	12	0,083381	0,150504	3,258095	0,040794
Cefalotina	0,340000	0,591667	-4,24727	25	0,000262	15	12	0,145406	0,162135	1,243346	0,689936
Ampicilina	0,346667	0,475000	-0,58071	25	0,566637	15	12	0,199523	0,830252	17,315409	0,000006
Estreptomicina	0,473333	0,208333	5,41946	25	0,000013	15	12	0,127988	0,124011	1,065165	0,931940
Sulfa-Trimetropim	0,833333	0,533333	2,10663	25	0,045355	15	12	0,149603	0,528004	12,456480	0,000042

Ovino e bovino											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,966667	0,930000	0,41949	23	0,678750	15	10	0,263674	0,094868	7,724868	0,004140
Cloranfenicol	0,873333	0,890000	-0,30271	23	0,764832	15	10	0,153375	0,099443	2,378812	0,194019
Tetraciclina	0,420000	0,400000	0,61914	23	0,541909	15	10	0,077460	0,081650	1,111111	0,829404
Gentamicina	0,500000	0,480000	0,99283	23	0,331123	15	10	0,037796	0,063246	2,800000	0,082274
Penicilina	0,206667	0,170000	1,43313	23	0,165274	15	10	0,070373	0,048305	2,122449	0,258389
Polimixina B	0,333333	0,320000	0,59485	23	0,557751	15	10	0,061721	0,042164	2,142857	0,252432
Vancomicina	0,093333	0,100000	-0,09299	23	0,926719	15	10	0,186956	0,156347	1,429870	0,598988
Eritromicina	0,286667	0,170000	3,98412	23	0,000585	15	10	0,083381	0,048305	2,979592	0,104536
Cefalotina	0,340000	0,290000	1,03031	23	0,313578	15	10	0,145406	0,056765	6,561576	0,007613
Ampicilina	0,346667	0,320000	0,40000	23	0,692847	15	10	0,199523	0,078881	6,397959	0,008351
Estreptomicina	0,473333	0,310000	3,40074	23	0,002454	15	10	0,127988	0,099443	1,656501	0,450570
Sulfa-Trimetropim	0,833333	0,590000	3,51239	23	0,001871	15	10	0,149603	0,196921	1,732624	0,343947

ovino e galinha

	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,966667	0,950000	0,17885	23	0,859618	15	10	0,263674	0,158114	2,780952	0,127246
Cloranfenicol	0,873333	0,950000	-1,43422	23	0,164968	15	10	0,153375	0,084984	3,257143	0,080394
Tetraciclina	0,420000	0,170000	3,97815	23	0,000594	15	10	0,077460	0,226323	8,537037	0,000506
Gentamicina	0,500000	0,430000	2,88932	23	0,008275	15	10	0,037796	0,082327	4,744444	0,009742
Penicilina	0,206667	0,210000	-0,09841	23	0,922461	15	10	0,070373	0,099443	1,996795	0,237567
Polimixina B	0,333333	0,350000	-0,49204	23	0,627353	15	10	0,061721	0,108012	3,062500	0,059583
Vancomicina	0,093333	0,060000	0,52641	23	0,603643	15	10	0,186956	0,084327	4,915179	0,021290
Eritromicina	0,286667	0,210000	2,53389	23	0,018551	15	10	0,083381	0,056765	2,157635	0,248219
Cefalotina	0,340000	0,380000	-0,73207	23	0,471522	15	10	0,145406	0,113529	1,640394	0,459661
Ampicilina	0,346667	0,350000	-0,04545	23	0,964142	15	10	0,199523	0,143372	1,936680	0,320806
Estreptomicina	0,473333	0,310000	2,89809	23	0,008108	15	10	0,127988	0,152388	1,417636	0,538552
Sulfa-Trimetropim	0,833333	0,800000	0,34432	23	0,733733	15	10	0,149603	0,329983	4,865248	0,008683

Ovino e suino

	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,966667	1,000000	-0,39691	23	0,695096	15	10	0,263674	0,000000	0,000000	1,000000
Cloranfenicol	0,873333	0,740000	1,54084	23	0,137002	15	10	0,153375	0,279682	3,325236	0,043645
Tetraciclina	0,420000	0,170000	4,21705	23	0,000328	15	10	0,077460	0,211082	7,425926	0,001070
Gentamicina	0,500000	0,450000	1,81265	23	0,082960	15	10	0,037796	0,097183	6,611111	0,001956
Penicilina	0,206667	0,150000	1,69448	23	0,103673	15	10	0,070373	0,097183	1,907051	0,269137
Polimixina B	0,333333	0,330000	0,12749	23	0,899658	15	10	0,061721	0,067495	1,195833	0,737254
Vancomicina	0,093333	0,070000	0,36949	23	0,715142	15	10	0,186956	0,082327	5,156909	0,018034
Eritromicina	0,286667	0,190000	2,96855	23	0,006879	15	10	0,083381	0,073786	1,276968	0,728152
Cefalotina	0,340000	0,360000	-0,38113	23	0,706602	15	10	0,145406	0,096609	2,265306	0,219880
Ampicilina	0,346667	0,300000	0,60638	23	0,550200	15	10	0,199523	0,169967	1,378022	0,639879
Estreptomicina	0,473333	0,320000	2,98010	23	0,006696	15	10	0,127988	0,122927	1,084034	0,931530
Sulfa-Trimetropim	0,833333	0,430000	3,08795	23	0,005194	15	10	0,149603	0,476212	10,132624	0,000195

Ovino e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,966667	0,930000	0,39088	23	0,699484	15	10	0,263674	0,163639	2,596325	0,153809
Cloranfenicol	0,873333	0,660000	3,05410	23	0,005626	15	10	0,153375	0,195505	1,624831	0,400803
Tetraciclina	0,420000	0,310000	1,80415	23	0,084321	15	10	0,077460	0,218327	7,944444	0,000747
Gentamicina	0,500000	0,400000	5,87367	23	0,000005	15	10	0,037796	0,047140	1,555556	0,442373
Penicilina	0,206667	0,130000	2,32284	23	0,029390	15	10	0,070373	0,094868	1,817308	0,305210
Polimixina B	0,333333	0,310000	1,09788	23	0,283617	15	10	0,061721	0,031623	3,809524	0,049519
Vancomicina	0,093333	0,030000	1,04147	23	0,308484	15	10	0,186956	0,048305	14,979592	0,000299
Eritromicina	0,286667	0,150000	3,40486	23	0,002430	15	10	0,083381	0,117851	1,997717	0,237264
Cefalotina	0,340000	0,250000	1,86608	23	0,074834	15	10	0,145406	0,052705	7,611429	0,004378
Ampicilina	0,346667	0,280000	1,01671	23	0,319866	15	10	0,199523	0,063246	9,952381	0,001555
Estreptomicina	0,473333	0,340000	3,11195	23	0,004907	15	10	0,127988	0,051640	6,142857	0,009684
Sulfa-Trimetropim	0,833333	0,780000	0,58956	23	0,561234	15	10	0,149603	0,301109	4,051064	0,019555
Humano e bovino											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	1,516667	0,930000	15,43177	20	0,000000	12	10	0,083485	0,094868	1,291304	0,678256
Cloranfenicol	0,575000	0,890000	-1,82458	20	0,083040	12	10	0,536190	0,099443	29,073034	0,000022
Tetraciclina	1,225000	0,400000	7,99193	20	0,000000	12	10	0,316587	0,081650	15,034091	0,000352
Gentamicina	0,400000	0,480000	-3,03094	20	0,006599	12	10	0,060302	0,063246	1,100000	0,866661
Penicilina	0,100000	0,170000	-1,63078	20	0,118586	12	10	0,127920	0,048305	7,012987	0,006840
Polimixina B	0,533333	0,320000	10,78720	20	0,000000	12	10	0,049237	0,042164	1,363636	0,651930
Vancomicina	0,158333	0,100000	1,17436	20	0,254046	12	10	0,066856	0,156347	5,468927	0,010504
Eritromicina	0,108333	0,170000	-1,23916	20	0,229630	12	10	0,150504	0,048305	9,707792	0,002008
Cefalotina	0,591667	0,290000	5,58591	20	0,000018	12	10	0,162135	0,056765	8,158307	0,003901
Ampicilina	0,250000	0,320000	-0,88273	20	0,387867	12	10	0,239317	0,078881	9,204545	0,002466
Estreptomicina	0,208333	0,310000	-2,08989	20	0,049610	12	10	0,124011	0,099443	1,555158	0,516602
Sulfa-Trimetropim	0,533333	0,590000	-0,32025	20	0,752103	12	10	0,528004	0,196921	7,189372	0,006245

Humano e Galinha											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	1,516667	0,950000	10,77602	20	0,000000	12	10	0,083485	0,158114	3,586957	0,050045
Cloranfenicol	0,575000	0,950000	-2,18018	20	0,041363	12	10	0,536190	0,084984	39,807692	0,000006
Tetraciclina	1,225000	0,170000	8,81247	20	0,000000	12	10	0,316587	0,226323	1,956715	0,322925
Gentamicina	0,400000	0,430000	-0,98595	20	0,335936	12	10	0,060302	0,082327	1,863889	0,327516
Penicilina	0,100000	0,210000	-2,21519	20	0,038516	12	10	0,127920	0,099443	1,654750	0,458599
Polimixina B	0,533333	0,350000	5,27713	20	0,000036	12	10	0,049237	0,108012	4,812500	0,017294
Vancomicina	0,158333	0,060000	3,05306	20	0,006278	12	10	0,066856	0,084327	1,590960	0,461586
Eritromicina	0,108333	0,210000	-2,01335	20	0,057732	12	10	0,150504	0,056765	7,029781	0,006781
Cefalotina	0,591667	0,380000	3,47320	20	0,002399	12	10	0,162135	0,113529	2,039577	0,294171
Ampicilina	0,250000	0,350000	-1,15695	20	0,260924	12	10	0,239317	0,143372	2,786241	0,134868
Estreptomicina	0,208333	0,310000	-1,72676	20	0,099626	12	10	0,124011	0,152388	1,510016	0,511889
Sulfa-Trimetropim	0,533333	0,800000	-1,38457	20	0,181439	12	10	0,528004	0,329983	2,560297	0,168847

Humano e suíno											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	1,516667	1,000000	19,48953	20	0,000000	12	10	0,083485	0,000000	0,000000	1,000000
Cloranfenicol	0,575000	0,740000	-0,87643	20	0,391200	12	10	0,536190	0,279682	3,675426	0,060625
Tetraciclina	1,225000	0,170000	8,98659	20	0,000000	12	10	0,316587	0,211082	2,249490	0,233682
Gentamicina	0,400000	0,450000	-1,47710	20	0,155224	12	10	0,060302	0,097183	2,597222	0,138298
Penicilina	0,100000	0,150000	-1,01447	20	0,322472	12	10	0,127920	0,097183	1,732620	0,418284
Polimixina B	0,533333	0,330000	8,16423	20	0,000000	12	10	0,049237	0,067495	1,879167	0,321385
Vancomicina	0,158333	0,070000	2,77967	20	0,011565	12	10	0,066856	0,082327	1,516384	0,507730
Eritromicina	0,108333	0,190000	-1,56210	20	0,133949	12	10	0,150504	0,073786	4,160482	0,041170
Cefalotina	0,591667	0,360000	3,96101	20	0,000771	12	10	0,162135	0,096609	2,816558	0,130956
Ampicilina	0,250000	0,300000	-0,55357	20	0,586012	12	10	0,239317	0,169967	1,982517	0,313637
Estreptomicina	0,208333	0,320000	-2,11130	20	0,047530	12	10	0,124011	0,122927	1,017714	0,995639
Sulfa-Trimetropim	0,533333	0,430000	0,47756	20	0,638144	12	10	0,528004	0,476212	1,229344	0,768764

Humano e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	1,516667	0,930000	10,87176	20	0,000000	12	10	0,083485	0,163639	3,842029	0,039474
Cloranfenicol	0,575000	0,660000	-0,47411	20	0,640559	12	10	0,536190	0,195505	7,521802	0,005285
Tetraciclina	1,225000	0,310000	7,72248	20	0,000000	12	10	0,316587	0,218327	2,102670	0,274255
Gentamicina	0,400000	0,400000	0,00000	20	1,000000	12	10	0,060302	0,047140	1,636364	0,468740
Penicilina	0,100000	0,130000	-0,61333	20	0,546570	12	10	0,127920	0,094868	1,818182	0,378522
Polimixina B	0,533333	0,310000	12,35141	20	0,000000	12	10	0,049237	0,031623	2,424242	0,194210
Vancomicina	0,158333	0,030000	5,06021	20	0,000060	12	10	0,066856	0,048305	1,915584	0,338392
Eritromicina	0,108333	0,150000	-0,71146	20	0,485015	12	10	0,150504	0,117851	1,630909	0,471796
Cefalotina	0,591667	0,250000	6,36674	20	0,000003	12	10	0,162135	0,052705	9,463636	0,002216
Ampicilina	0,250000	0,280000	-0,38395	20	0,705065	12	10	0,239317	0,063246	14,318182	0,000429
Estreptomicina	0,208333	0,340000	-3,12899	20	0,005285	12	10	0,124011	0,051640	5,767045	0,013783
Sulfa-Trimetropim	0,533333	0,780000	-1,30749	20	0,205877	12	10	0,528004	0,301109	3,074866	0,102577

Bovino e galinha											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,930000	0,950000	-0,34300	18	0,735574	10	10	0,094868	0,158114	2,777778	0,144063
Cloranfenicol	0,890000	0,950000	-1,45048	18	0,164128	10	10	0,099443	0,084984	1,369231	0,647258
Tetraciclina	0,400000	0,170000	3,02294	18	0,007311	10	10	0,081650	0,226323	7,683333	0,005601
Gentamicina	0,480000	0,430000	1,52302	18	0,145129	10	10	0,063246	0,082327	1,694444	0,444186
Penicilina	0,170000	0,210000	-1,14416	18	0,267547	10	10	0,048305	0,099443	4,238095	0,042646
Polimixina B	0,320000	0,350000	-0,81818	18	0,423953	10	10	0,042164	0,108012	6,562500	0,009885
Vancomicina	0,100000	0,060000	0,71207	18	0,485550	10	10	0,156347	0,084327	3,437500	0,080080
Eritromicina	0,170000	0,210000	-1,69706	18	0,106909	10	10	0,048305	0,056765	1,380952	0,638401
Cefalotina	0,290000	0,380000	-2,24223	18	0,037780	10	10	0,056765	0,113529	4,000000	0,051003
Ampicilina	0,320000	0,350000	-0,57974	18	0,569275	10	10	0,078881	0,143372	3,303571	0,089733
Estreptomicina	0,310000	0,310000	0,00000	18	1,000000	10	10	0,099443	0,152388	2,348315	0,219488
Sulfa-Trimetropim	0,590000	0,800000	-1,72814	18	0,101080	10	10	0,196921	0,329983	2,808023	0,140023

Bovino e suino											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,930000	1,000000	-2,33333	18	0,031429	10	10	0,094868	0,000000	0,000000	1,000000
Cloranfenicol	0,890000	0,740000	1,59800	18	0,127450	10	10	0,099443	0,279682	7,910112	0,005033
Tetraciclina	0,400000	0,170000	3,21365	18	0,004816	10	10	0,081650	0,211082	6,683333	0,009265
Gentamicina	0,480000	0,450000	0,81818	18	0,423953	10	10	0,063246	0,097183	2,361111	0,216649
Penicilina	0,170000	0,150000	0,58277	18	0,567277	10	10	0,048305	0,097183	4,047619	0,049183
Polimixina B	0,320000	0,330000	-0,39736	18	0,695775	10	10	0,042164	0,067495	2,562500	0,177193
Vancomicina	0,100000	0,070000	0,53689	18	0,597915	10	10	0,156347	0,082327	3,606557	0,069616
Eritromicina	0,170000	0,190000	-0,71714	18	0,482493	10	10	0,048305	0,073786	2,333333	0,222868
Cefalotina	0,290000	0,360000	-1,97551	18	0,063746	10	10	0,056765	0,096609	2,896552	0,128950
Ampicilina	0,320000	0,300000	0,33753	18	0,739624	10	10	0,078881	0,169967	4,642857	0,031922
Estreptomicina	0,310000	0,320000	-0,20000	18	0,843723	10	10	0,099443	0,122927	1,528090	0,537623
Sulfa-Trimetropim	0,59	0,43	0,9818435	18	0,339191	10	10	0,196921	0,476212	5,848138	0,014784

Bovino e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,930000	0,930000	0,00000	18	1,000000	10	10	0,094868	0,163639	2,975309	0,119968
Cloranfenicol	0,890000	0,660000	3,31593	18	0,003844	10	10	0,099443	0,195505	3,865169	0,056615
Tetraciclina	0,400000	0,310000	1,22098	18	0,237846	10	10	0,081650	0,218327	7,150000	0,007275
Gentamicina	0,480000	0,400000	3,20713	18	0,004885	10	10	0,063246	0,047140	1,800000	0,394383
Penicilina	0,170000	0,130000	1,18818	18	0,250205	10	10	0,048305	0,094868	3,857143	0,056972
Polimixina B	0,320000	0,310000	0,60000	18	0,555985	10	10	0,042164	0,031623	1,777778	0,404320
Vancomicina	0,100000	0,030000	1,35273	18	0,192892	10	10	0,156347	0,048305	10,476190	0,001741
Eritromicina	0,170000	0,150000	0,49656	18	0,625507	10	10	0,048305	0,117851	5,952381	0,013909
Cefalotina	0,290000	0,250000	1,63299	18	0,119840	10	10	0,056765	0,052705	1,160000	0,828639
Ampicilina	0,320000	0,280000	1,25109	18	0,226920	10	10	0,078881	0,063246	1,555556	0,520801
Estreptomicina	0,310000	0,340000	-0,84665	18	0,408307	10	10	0,099443	0,051640	3,708333	0,064109
Sulfa-Trimetropim	0,590000	0,780000	-1,66998	18	0,112220	10	10	0,196921	0,301109	2,338109	0,221784

galinha e suino											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,950000	1,000000	-1,00000	18	0,330565	10	10	0,158114	0,000000	0,000000	1,000000
Cloranfenicol	0,950000	0,740000	2,27184	18	0,035596	10	10	0,084984	0,279682	10,830769	0,001531
Tetraciclina	0,170000	0,170000	0,00000	18	1,000000	10	10	0,226323	0,211082	1,149626	0,838856
Gentamicina	0,430000	0,450000	-0,49656	18	0,625507	10	10	0,082327	0,097183	1,393443	0,629104
Penicilina	0,210000	0,150000	1,36458	18	0,189204	10	10	0,099443	0,097183	1,047059	0,946511
Polimixina B	0,350000	0,330000	0,49656	18	0,625507	10	10	0,108012	0,067495	2,560976	0,177458
Vancomicina	0,060000	0,070000	-0,26833	18	0,791498	10	10	0,084327	0,082327	1,049180	0,944161
Eritromicina	0,210000	0,190000	0,67937	18	0,505549	10	10	0,056765	0,073786	1,689655	0,446608
Cefalotina	0,380000	0,360000	0,42426	18	0,676401	10	10	0,113529	0,096609	1,380952	0,638401
Ampicilina	0,350000	0,300000	0,71107	18	0,486155	10	10	0,143372	0,169967	1,405405	0,620335
Estreptomicina	0,310000	0,320000	-0,16151	18	0,873487	10	10	0,152388	0,122927	1,536765	0,532246
Sulfa-Trimetropim	0,800000	0,430000	2,01952	18	0,058577	10	10	0,329983	0,476212	2,082653	0,289571

Galinha e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	0,950000	0,930000	0,27794	18	0,784222	10	10	0,158114	0,163639	1,071111	0,920171
Cloranfenicol	0,950000	0,660000	4,30187	18	0,000429	10	10	0,084984	0,195505	5,292308	0,020756
Tetraciclina	0,170000	0,310000	-1,40784	18	0,176214	10	10	0,226323	0,218327	1,074592	0,916415
Gentamicina	0,430000	0,400000	1,00000	18	0,330565	10	10	0,082327	0,047140	3,050000	0,112131
Polimixina B	0,350000	0,310000	1,12390	18	0,275820	10	10	0,108012	0,031623	11,666667	0,001145
Vancomicina	0,060000	0,030000	0,97619	18	0,341910	10	10	0,084327	0,048305	3,047619	0,112372
Eritromicina	0,210000	0,150000	1,45048	18	0,164128	10	10	0,056765	0,117851	4,310345	0,040444
Cefalotina	0,380000	0,250000	3,28439	18	0,004121	10	10	0,113529	0,052705	4,640000	0,031986
Ampicilina	0,350000	0,280000	1,41261	18	0,174827	10	10	0,143372	0,063246	5,138889	0,022897
Estreptomicina	0,310000	0,340000	-0,58961	18	0,562781	10	10	0,152388	0,051640	8,708333	0,003521
Sulfa-Trimetropim	0,8	0,78	0,1415788	18	0,888985	10	10	0,329983	0,301109	1,20098	0,789457

Suino e marreco											
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
Imipenem	1,000000	0,930000	1,35273	18	0,192892	10	10	0,000000	0,163639	0,000000	1,000000
Cloranfenicol	0,740000	0,660000	0,74136	18	0,468037	10	10	0,279682	0,195505	2,046512	0,300997
Tetraciclina	0,170000	0,310000	-1,45784	18	0,162111	10	10	0,211082	0,218327	1,069825	0,921562
Gentamicina	0,450000	0,400000	1,46385	18	0,160481	10	10	0,097183	0,047140	4,250000	0,042273
Penicilina	0,150000	0,130000	0,46569	18	0,647023	10	10	0,097183	0,094868	1,049383	0,943937
Polimixina B	0,330000	0,310000	0,84853	18	0,407287	10	10	0,067495	0,031623	4,555556	0,033930
Vancomicina	0,070000	0,030000	1,32518	18	0,201688	10	10	0,082327	0,048305	2,904762	0,127977
Eritromicina	0,190000	0,150000	0,90972	18	0,374992	10	10	0,073786	0,117851	2,551020	0,179201
Cefalotina	0,360000	0,250000	3,16083	18	0,005408	10	10	0,096609	0,052705	3,360000	0,085504
Ampicilina	0,300000	0,280000	0,34874	18	0,731328	10	10	0,169967	0,063246	7,222222	0,007016
Estreptomicina	0,320000	0,340000	-0,47434	18	0,640960	10	10	0,122927	0,051640	5,666667	0,016471
Sulfa-Trimetropim	0,430000	0,780000	-1,96442	18	0,065112	10	10	0,476212	0,301109	2,501225	0,188225